

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-503361

(43)公表日 平成10年(1998)3月31日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | | | | |
|--------------------------|-------|---------|---------------|-----|--------|---|----------|
| C 1 2 N 7/00 | | 9735-4B | C 1 2 N 7/00 | | | | |
| A 6 1 K 9/127 | | 7329-4C | A 6 1 K 9/127 | | | L | |
| 35/76 | | 8115-4C | 35/76 | | | | |
| 48/00 | A D U | 9051-4C | 48/00 | | A D U | | |
| C 1 2 N 15/09 | | 9282-4B | C 1 2 N 15/00 | | A | | |
| | | | 審査請求 | 未請求 | 予備審査請求 | 有 | (全 70 頁) |

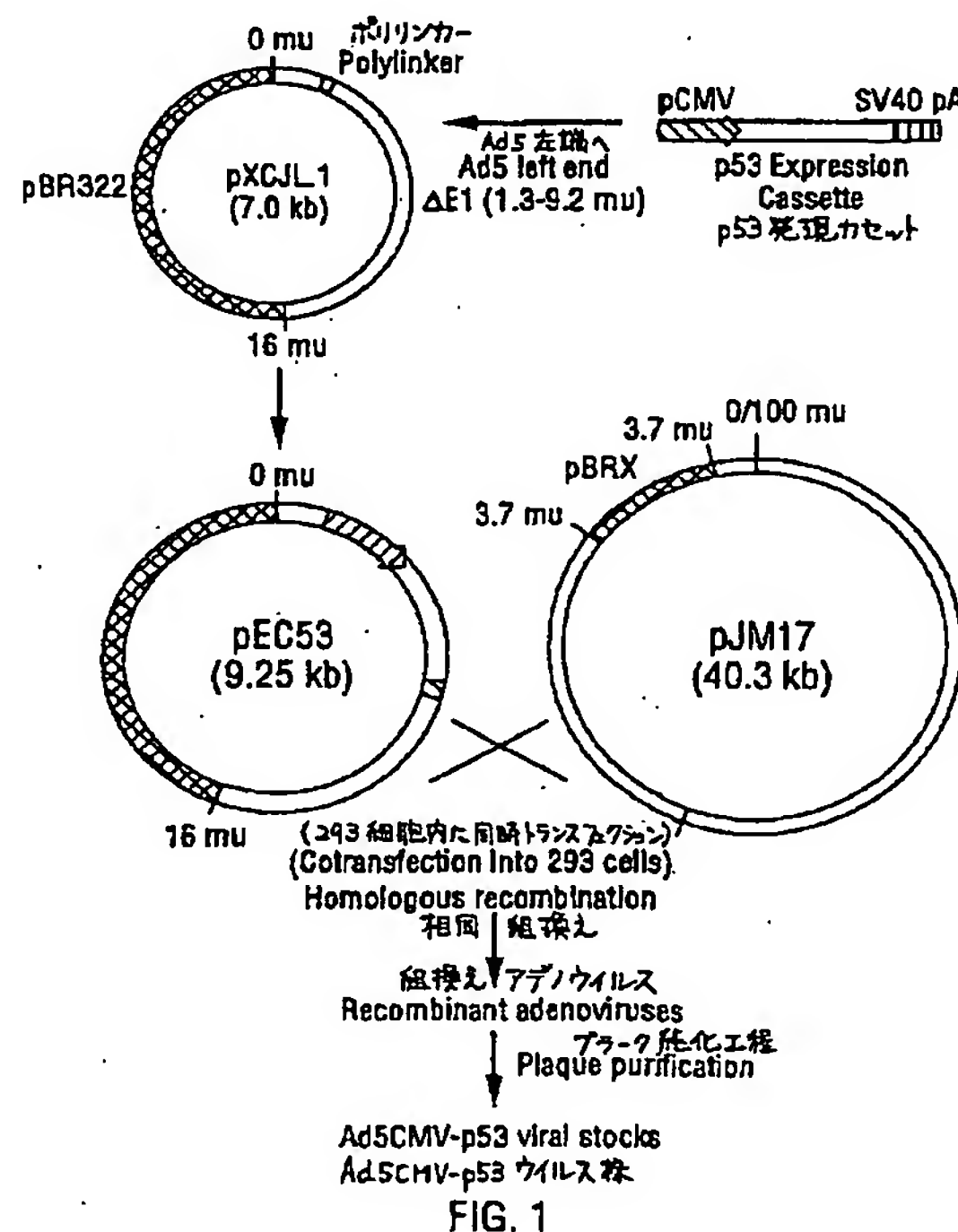
| | | | |
|--------------|------------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平7-513310 | (71)出願人 | ボード・オヴ・リージェンツ, ザ・ユニヴァーシティ・オヴ・テキサス・システム アメリカ合衆国、78701 テキサス、オー スティン、ウェスト・セブンス・ストリー ト 201 |
| (86) (22)出願日 | 平成6年(1994)10月28日 | (72)発明者 | ツァン, ウエイ・ウェイ アメリカ合衆国、77479 テキサス、シュ ガー・ランド、スペンサーズ・グレン 423 |
| (85)翻訳文提出日 | 平成8年(1996)4月30日 | (72)発明者 | ロス, ジャック・エイ アメリカ合衆国、77004 テキサス、ヒュ ーストン、ボルソーヴァー 2324 |
| (86)国際出願番号 | PCT/US94/12401 | (74)代理人 | 弁理士 奥山 尚男 (外3名) |
| (87)国際公開番号 | WO95/12660 | | |
| (87)国際公開日 | 平成7年(1995)5月11日 | | |
| (31)優先権主張番号 | 08/145, 826 | | |
| (32)優先日 | 1993年10月29日 | | |
| (33)優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え p53 アデノウイルス方法と組成物

(57) 【要約】

リポソームを介する同時トランスフェクション、及び、トランスフェクションされた細胞中で細胞変性効果（CPE）を直接観察することにより、組換えアデノウイルスを製造する簡単で効率的な方法を開示した。さらにまた、新規の p53 アデノウイルス構成物についての組成物及び方法、ならびに変異 p53 を持つ細胞と動物が p53 の機能と腫瘍抑制力を回復する方法も開示した。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 組換えアデノウイルスにおいて、p53をコードする発現領域を含むベクター構成物を担持するウイルスであって、ベクターは、ヒト悪性細胞中でp53を発現することができるウイルス。
2. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスにおいて、ベクター構成物は、サイトメガロウイルス1Eプロモーターの制御下に置かれているp53発現領域を含むウイルス。
3. 請求項2に記載の組換えアデノウイルスにおいて、ベクター構成物は、p53発現領域と、サイトメガロウイルス1Eプロモーターと、SV40初期ボリアデニル化シグナルとを含むウイルス。
4. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスにおいて、アデノウイルス複製に必須の遺伝子がベクター構成物から欠失していて、その位置にp53発現領域が導入されているウイルス。
5. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスにおいて、アデノウイルスベクターのE1A領域及びE1B領域が欠失していて、その位置にp53発現領域が導入されているウイルス。
6. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスにおいて、図1のゲノム構成を持つウイルス。
7. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスにおいて、薬理的に許容し得る処方中に分散しているウイルス。
8. 請求項1に記載の組換えアデノウイルスに感染している組換え宿主細胞。
9. 野生型p53を欠失している細胞に野生型p53タンパク質の機能を回復させる方法において、細胞中で野生型p53を発現するための有効量の請求項1に記載の組換えアデノウイルスを、細胞に接触させることを含む方法。
10. 請求項9に記載の方法において、細胞がp53遺伝子に突然変異をもつ癌細胞である方法。
11. 請求項10に記載の方法において、細胞がヒト肺癌細胞である方法。

12. 請求項10に記載の方法において、細胞がヒト乳癌細胞である方法。
13. 請求項9に記載の方法において、細胞が哺乳動物の体内に位置し、アデノウイルスが薬理学的に許容できる剤形で哺乳動物に投与される方法。
14. 組換えアデノウイルスを産生する方法において、
アデノウイルスプラスミド及び発現ベクターを、リボソームを介するトランスフェクションにより好適な宿主細胞に導入すること、及び、
相同組換えとウイルスの産生が行われたことを示す細胞変性効果があるかどうか培養した宿主細胞を解析することを含む方法。
15. 請求項14に記載の方法において、リボソームを介するトランスフェクション工程がDOTAPを介するトランスフェクションである方法。
16. 請求項14に記載の方法において、アデノウイルスプラスミドは、複製欠損性アデノウイルスプラスミドであって、宿主細胞がこの欠損を相補する方法。
17. 請求項16に記載の方法において、アデノウイルスプラスミドは機能的なE1A及びE1Bを欠失していて、宿主細胞がE1を発現している細胞である方法。
18. 請求項17記載の方法において、宿主細胞が293細胞である方法。
19. 請求項14記載の方法において、宿主細胞が最小必須培地で培養されている方法。
20. 請求項14記載の方法において、細胞変異効果を示す細胞の上澄み液からDNAを採取すること、及び、発現ベクターに特異的なDNAプライマーとアデノウイルスゲノムに特異的なDNAプライマーを用いて、組換えアデノウイルスが存在していることを確認するために、PCRによってDNAを解析すること

をさらに含む方法。
21. 請求項14記載の方法において、ヒト転移細胞中でp53を発現させることができるプロモーターの制御下に置かれているp53をコードしているDNAセグメントを発現ベクターが含む方法。

【発明の詳細な説明】

組換え p 5 3 アデノウイルス

方法と組成物

発明の背景1. 発明の分野

本発明は一般には、組換え技術の分野に関する。本発明の一部の態様においては、組換えアデノウイルスを産生させる簡単で能率的な方法に関する。他の態様においては、異常な p 5 3 を持つ細胞が正常な p 5 3 機能と増殖の抑制力を回復する方法を含む、p 5 3 アデノウイルス構成物 (construct) に関する新規な組成物と方法に関する。

2. 関連技術の説明

放射線療法、外科手術、及び化学療法を始めとする現在の癌治療方法では、効果に限度があることが知られている。アメリカ合衆国では、肺癌のみをとってみても死亡数は年間140,000人以上に達している。最近の年齢別統計では、肺癌の死亡率は、女性の乳癌死亡率を超えている。禁煙運動が行われるようになって喫煙の慣習は減ってきたが、肺癌死亡率は高いまま21世紀を迎えることになろう。肺癌の新しい治療方法の合理的な開発は、肺癌の分子レベルの生物学の理解しだいである。

現在の確立された理論では、各種癌の病因の少なくとも一部は、遺伝子に異常が生じて一以上の遺伝子が過剰発現するか、あるいは、異常又は変異遺伝子が発現することにあるとされている。例えば、多くの症例においてガン遺伝子が発現したことが原因となって癌が発病したことが知られている。「ガン遺伝子」とは、遺伝的に変質した遺伝子で、発現産物が突然変異しているために正常細胞の機能

や制御を何らかの理由で破壊するのである (Spandidos et al., 1989)。

今日まで研究されたほとんどのガン遺伝子は、正常細胞遺伝子のコード領域、つまり、「原ガン遺伝子」が、突然変異、それも多くは点突然変異をおこすことによって、「活性化され」、発現したタンパク質産物のアミノ酸を置換すること

がわかっている。この変質した発現産物は、新生物形成過程に参加する異常な生物機能を示すようになる (Travali et al., 1990)。このような基礎となる突然変異は、化学的突然変異形成や電離放射線など各種手段により発生する。現在では、ras, myc, neu, raf, erb, src, fos, junやablを始めとして、多くのガン遺伝子やガン遺伝子群が同定されて、遺伝子によって差はあるものの、特徴付けもなされている (Travali et al., 1990; Bishop, 1987)。

正常細胞が増殖している間は、増殖を促進する原ガン遺伝子と、増殖を制御するガン抑制遺伝子とが均衡を保っていると考えられている。いくつかの要因により、これら二つの力の均衡が崩れ、新生物形成状態になる。この要因の一つが、ガン抑制遺伝子の突然変異である (Weinberg, 1991)。

重要なガン抑制遺伝子は、細胞タンパク質をコードしている遺伝子である p53 である。p53 は細胞の増殖を制御している 53 kD の核リンタンパク質である。p53 遺伝子が突然変異していて、さらに、この遺伝子が存在している染色体 17 p から対立遺伝子が排除されていることが、ヒトの悪性腫瘍で最も頻繁に見いだされる変化である。p53 タンパク質は進化を通して保存度が高く、ほとんどの正常組織で発現されている。野生型 p53 は、細胞周期の制御 (Mercer, 1992)、転写の調節 (Fields et al., 1990, and Miez et al., 1992)、DNA の複製 (Wilcock and Lane, 1991, and Bargonetti et al., 1991)、及びアポトーシスの誘発 (Yonish-Rouach et al., 1991, and Shaw et al., 1992) に関与していることが立証されている。

各種の突然変異 p53 対立遺伝子は、1 個の塩基が置換されただけで、全く異なる成長調節特性をもつタンパク質が合成されるようになって、最後には悪性腫瘍をもたらすことが知られている (Hollstein et al., 1991)。事実、p53 遺伝子は、ごく普通に見られるヒトの癌で、突然変異している頻度が最も高い遺伝子であって (Hollstein et al., 1991; Weinberg, 1991)、特に喫煙に起因する癌に関与することが認められている (Hollstein et al., 1991; Zakut-Houri et al., 1985)。乳癌中の p53 の過剰発現も報告されている (Casey et al., 19

91)。

癌の遺伝子療法で最も挑戦的な態様の一つは、p53のようなガン抑制遺伝子を利用することである。野生型p53をある種の乳癌細胞や肺癌細胞にトランスフェクションすると、これらの細胞系が増殖を抑制する制御能力を回復することが報告されている (Casey et al., 1991; Takahashi et al., 1992)。DNAのトランスフェクションは、患者の細胞内にDNAを導入する実行可能な手段ではない。しかしながら、これらの実験結果は、p53遺伝子の改良デリバリー手段さえ開発されれば、p53遺伝子が突然変異している癌細胞に野生型p53を供給して、効果的な治療方法とすることができることを示している。

遺伝子による腫瘍抑制療法に適用しようとして、遺伝子デリバリーシステムが研究開発されている。実際の生細胞を感染させる、つまり、ウイルスが自らの遺伝材料を伝達する過程の効率が良いので、ウイルス系遺伝子伝達媒体が特に興味深い。これまでにこの分野で、例えば、各種の遺伝子をデリバリーするように操作したレトロウイルスベクターの産生に、ある程度の進歩が見られた。しかしながら、遺伝子療法としてレトロウイルスベクターを使用するには、レトロウイルスは標的細胞にレトロウイルス受容体が存在しないと感染することができない点、濃縮及び精製が難しい点、複製している細胞にしか効率的に組み込むことができない点などの重大な欠陥がある。

アデノウイルスベクターシステムは、ある種の遺伝子伝達プロトコルに使用することを目的として最近提案されたものであるが、現在の組換えアデノウイルス製造方法にいくつかの問題がある。現在の製法は、発現ベクターとアデノウイルスプラスミドとをリン酸カルシウムを介して宿主細胞にトランスフェクションした後、このトランスフェクションした細胞をブランク解析する。この種のトランスフェクション工程と解析方法は、非能率的であり、しかも、低濃度のウイルスしか増殖できないという典型的な結果となる。

したがって、増殖に対する抑制力を回復する手段として、p53などのガン抑制遺伝子を細胞に導入する新しい方法を開発することが、明かに必要である。また、組換えアデノウイルスの製造方法としては、リン酸カルシウムを介したトラ

ンスフェクション工程と、アガロースで表面処理してブランク解析する試験方法を用いない方法が有利である。

発明の要旨

本発明は上記その他の問題を解決するためになされたもので、p53アデノウイルスなどの組換えアデノウイルスの能率的な製造方法、及び、異常p53を持つ細胞がp53の機能を回復できる効果的な手段を提供する。さらに、癌細胞のような異常なp53機能を持つ細胞中で野生型p53の発現を促進する組成物を使用する方法に用いる組換えアデノウイルスベクターとビリオンを開示する。さらにまた、リポソームを仲介としてDNAをトランスフェクションした後、細胞変性効果(cytopathic effect)(CPE)を観察し、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を行って、組換えアデノウイルスを増殖する簡単なプロトコルも開示する。

また、組換えアデノウイルスを産生増殖するこの新規方法を用いて、上記以外の遺伝子をビリオンゲノムに取り込むことも考えられる。これらの遺伝子としては、網膜芽腫(rb)遺伝子などのガン抑制遺伝子、抗c-mycや抗k-ras

sなどのアンチセンスガン遺伝子、及び癌遺伝子療法に用いる増殖制御関連遺伝子などを挙げることができる。

本発明者らは、本発明によって転移性増殖の制御に著しい効果を挙げることができることを立証した。Ad5CMV-p53組換えアデノウイルスが、形質転換した細胞の成長速度を顕著に低減できることが証明されている。このウイルスは、また、ウイルスに感染したH358細胞の腫瘍形成を抑制した。さらに、同所性肺癌も、まず、H226Br細胞を気管支内に接種した後、Ad5CMV-p53組換えアデノウイルスを気管支内滴注を行うことにより増殖を防止することができた。このように腫瘍形成が抑制されたことは、高濃度のp53タンパク質が一時的に発現しただけでも、殺腫瘍効果を誘発するに充分であることが示唆されている。

特異的な一実施態様において、本発明は突然変異又は異常p53遺伝子を持つと推定される標的細胞など、悪性腫瘍細胞タイプを含む標的細胞中に野生型p5

3 遺伝子を組み入れるベクター構成物に関する。これらの態様では、p 5 3 遺伝子がプロモーターによって制御されている遺伝子発現単位又は転写単位を調製し、この単位を組換えアデノウイルス内のアデノウイルスベクターに組み入れる。いくつかの理由からこの発明は全体として、驚異的に有利な発明である。第一の理由は、p 5 3 ウイルスは毒性があるため、アデノウイルスをつくる際に用いられるような、パッケージング細胞中に産生させることはできないと従来から考えられてきた点にある。第二の理由は、アデノウイルスのE 1 BはP 5 3 と結合するため、p 5 3 の機能に干渉する点にある。第三に、一旦p 5 3 を産生すると、p 5 3 アデノウイルスは各種癌細胞の成長抑制に予期せざるほど効果的であることが見いだされている点にある。最後に、コントロールウイルスでは抑制されず、Ad 5 CMV-p 5 3 を用いる治療を通じて肺癌細胞の腫瘍形成が抑制されるが、この新規なp 5 3 タンパク質デリバリー方法とその製剤は驚くべき治療効果があ

ることを示している点にある。

したがって本発明は、p 5 3 などのガン抑制遺伝子、アンチセンスガン遺伝子、その他の関連遺伝子をアデノウイルスに担持させてヒトの癌治療に使用する、アデノウイルスベクター構成物に関する。これは、一実施態様においては、組換えアデノウイルスピリオン又は粒子は、野生型p 5 3 をコードする発現領域を含む組換え挿入断片を含むベクター及びその製剤処方が組み入れられていて、ベクターがヒトの転移細胞中でp 5 3 を発現することができるものとなっている。ベクターのp 5 3 発現領域は、ゲノム配列を含んでもよいが、p 5 3 のc DNA配列の方が当業者からの入手が容易であり、操作も簡単であるので、p 5 3 のc DNA配列を用いて簡単化することを考慮している。ベクターの組換え挿入断片は、一般に、SV 4 0 又はプロタミン遺伝子のポリアデニル化シグナルなどのプロモーター領域及びポリアデニル化シグナルを含む。

好ましい実施態様においては、CMVプロモーター、ウイルスLTR、RSV又はSV 4 0 プロモーターなどの強力な構成的プロモーター、あるいは伸長因子-1 やアクチンプロモーターなどのような、哺乳動物の細胞において高濃度で発

現する遺伝子と結合しているプロモーターに、p53発現領域を制御させることを考慮している。現在のところ、最も好ましいプロモーターはサイトメガロウイルス(CMV) IEプロモーターである。

本発明では、p53のコード配列をE1Bを欠いているウイルスゲノムに挿入あるいは添加することにより、p53遺伝子又はcDNAを組換えアデノウイルスに導入する。しかしながら、好ましいアデノウイルスは、アデノウイルスベクター構成物から複製及び／又はパッケージングに必須なウイルス遺伝子を欠失させておき、その位置にp53発現領域を導入することができる、増殖欠損性ウイルス(replication defective viruses)である。E1Bの他にも、複製に必須の遺伝子(例えば、E1A、E2やE4)や、非必須の遺伝子(例えば、E3)を

欠失させておいて、p53で置換してもよい。

図1のゲノム構成で例示しているように、アデノウイルスベクターからE1AとE1Bを欠失させておいて、その位置にp53発現領域を導入しているベクターとピリオンが特に好ましい。

増殖欠損性アデノウイルスを製造する技術は当業者によく知られていて、Ghosh-Choudhury and Grahama(1987)、McGrory et al., (1988)、及びGluzmann et al., (1982)に例示されている。これらの文献各々は、引用することにより本発明の一部とする。各種細胞系に既に複製欠失があるとしても、欠失を相補できさえすれば、これらの細胞系を用いて組換えアデノウイルスを増殖できることもよく知られている。好ましい細胞系はヒト293細胞系であるが、複製を許容できる、即ち、好ましい場合E1AとE1Bを発現できる他の細胞系も使用することができる。さらに、細胞をプラスチック皿や懸濁培地で増殖して、ウイルス株を得ることができる。

本発明は、E1を欠いているウイルスとE1を発現する細胞の組合せだけに限らない。本発明では、p53ベクターがE1Bを持たない限り、上記以外でもお互いに相補しているウイルスと宿主細胞との組合せを実際に使用することができる。機能的なE2を欠いているウイルスとE2を発現する細胞との組合せでもよ

いし、機能的なE 4を欠いているウイルスとE 4を発現する細胞との組合せなどでもよい。例えばE 3のような複製に必須ではない遺伝子が欠失し、これが置換されている場合、この欠失を宿主細胞が特異的に相補する必要はない。

アデノウイルスのベクターやビリオンの固有の性質は、E 1 Bを持っていはいけないという条件以外、本発明の実施に重要であるとは考えられていない。アデノウイルスは、これまでに異なる42の血清型とサブグループA～Fが知られているが、このうち、どのアデノウイルスでもよい。本発明の方法に使用する増殖欠損性アデノウイルスベクターの出発原料としては、サブグループCのタイプ

5アデノウイルスが好ましい。タイプ5のアデノウイルスは、大量の生化学及び遺伝学情報が蓄積されていて、歴史的にアデノウイルスをベクターとして用いるほとんどの構成物に使用されてきたヒトアデノウイルスだからである。

上記に関連する態様において、本発明は、新規なp 5 3 DNAセグメント、又は発現ベクター、及び本発明により製造するアデノウイルス p 5 3 ベクターを取り入れる組換え宿主細胞に関する。本発明のDNAセグメントは、一般に、転写の5' - 3' 方向に、サイトメガロウイルス I E プロモーター、野生型ヒト p 5 3 の構造遺伝子、及びSV 4 0 初期ポリアデニル化シグナルを含有している。組換えアデノウイルスを含有する宿主細胞は、一般に、真核細胞及び293細胞などの哺乳類細胞である。あるいは本発明のアデノウイルスに感染しているp 5 3 遺伝子欠失細胞でもよい。

他の実施態様において、本発明は、野生型p 5 3 をコードする組換えアデノウイルスを含み、薬理的に許容できる溶液又は緩衝液に分散させた製薬組成物に関する。好ましい薬理的に許容できる溶液としては、リン酸塩、乳酸塩、トリスなどで緩衝した中性塩類溶液が挙げられる。言うまでもなく、アデノウイルスは精製して、妨害する欠陥アデノウイルス粒子や、内毒素その他のパイロジェンなどの好ましからざる汚染物を実質的に皆無とし、ベクター構成物を服用する動物や患者に副作用が起きないようにすることが望ましい。ベクター精製の好ましい手段としては、塩化セシウム密度勾配遠心法などの浮遊密度勾配法の使用が挙げられる。

さらに他の実施態様において、本発明は、野生型 p 5 3 欠損細胞に p 5 3 機能を与える方法、あるいはこの細胞が野生型 p 5 3 タンパク質の機能を回復する方法に関する。これを達成する手段として、p 5 3 突然変異を持つ細胞を、野生型 p 5 3 がこの細胞内で発現するのに十分な有効量の組換えアデノウイルスに接触させる。これは、例えば癌細胞などの、欠陥 p 5 3 を含む細胞を持つ動物又はヒ

ト患者に、生理的有効量のアデノウイルス含有製薬組成物を投与することにより達成することができる。したがって、本発明の範囲には、乳癌や肺癌などのヒト悪性腫瘍を有効に治療する方法も含まれるものとする。

さらに他の実施態様において、本発明は p 5 3 発現アデノウイルスを用いて、悪性増殖、さらには転移性増殖をも防止することに関する。一実施態様においては、p 5 3 遺伝子が突然変異している細胞の制御できない増殖を抑制するために、組換え p 5 3 を発現しているアデノウイルスが使われる。より好ましい実施態様においては、この p 5 3 を発現しているアデノウイルスによって、H 3 5 8 細胞の腫瘍形成と増殖を抑制するが、p 5 3 機能の存在を示すことができる他の細胞を使用してもよい。

さらに他の実施態様においては、p 5 3 を発現しているウイルスを気管支内に滴注することにより、同所性肺腫瘍の増殖を防止する。これについては、ヌードマウスに A d 5 C M V - p 5 3 ウイルスを用いる実験を行って、好成績をおさめた。H 3 5 8 細胞は通常では顕著な腫瘍塊をつくる細胞であるが、A d 5 C M V - p 5 3 ウイルスを感染させることにより腫瘍形成を抑制することができた。さらに、H 2 2 6 B r 細胞を気管内に接種した後、A d 5 C M V - p 5 3 ウイルスを気管内に滴注することにより、同所性肺癌の増殖を防止して、肺癌細胞に対する A d 5 C M V - p 5 3 の in vitro での効果を確認した。肺癌細胞の腫瘍形成がコントロールウイルスの A d 5 / R S V / G L 2 ではなく、A d 5 C M V - p 5 3 による治療によって抑制されたことは、p 5 3 タンパク質が治療効果を持っていることを示している。当業者は他のウイルスデリバリー方法も本発明の範囲に含まれていることを理解している。

本発明の実施態様のある一面は、正常な細胞機能の回復や、癌の治療を目的と

する p 5 3 構成物の使用を例示する。反面、組換えアデノウイルスによって標的細胞内、あるいは宿主細胞内で高濃度のガン抑制タンパク質を発現するために、

本発明を一般的に適用することを提案する。例えば、癌治療薬様相の一環として、発明者により考案された p 5 3 の置換に加え、特に例をあげると、網膜芽腫遺伝子 (r b)、アンチセンスガン遺伝子 (c - m y c や c - r a s)、その他関連遺伝子を導入してヒト癌の療法とすることが考えられている。

本発明で用いるアデノウイルスベクターは複製欠損性であるので、ガン細胞などのような、最終的に感染しなければならない細胞中で複製することができないことを指摘しなければならない。したがって、治療を開始した時のように、患者の治療を継続する必要があると判断される場合には、一定期間後、例えば6ヶ月後あるいは一年後ウイルスを再導入する必要がある可能性がある。

本発明のアデノウイルスベクターは、遺伝子療法とは直接関係がない実施態様においても有用性がある。このような、これまでと述べてきたところとは異なる用法としては、各種 p 5 3 遺伝子の in vitro 解析や突然変異誘発研究、さらに例えば抗体産生や他の態様で用いるタンパク質の組換え生産が挙げられる。新しく見いだされる p 5 3 の分子活性に関するすべての実施態様を含むヒトの治療とは関係がない実施態様においても同じことが言える。即ち、細胞へ p 5 3 をデリバリーするのに、他の関連ウイルスを使用することである。これにはヘルペス属ウイルス、例えば単純疱疹ウイルス (H S V)、エプスタインバーウイルス (E B V)、サイトメガロウイルス (C M V)、及び仮性狂犬病ウイルス (P R V) が好適である。

これまで述べてきたところとは異なる一実施態様において、本発明は非能率的なリン酸カルシウムによるトランスフェクションと単調なプラーク検定法によらないで、あらゆる種類の組換えアデノウイルスを簡単に生産する製法に関する。本発明の組換えアデノウイルス製法は、一般的にリポソームを介したトランスフェクションによりアデノウイルスプラスミドと発現ベクターを好適な宿主細胞に導入し、その後、相同組換えとウイルス産生が行われていることを示す細胞変性

効果（CPE）が培養した宿主細胞中に存在するかどうかを解析する。第一工程のトランスフェクションの効率が上がれば、第二工程のCPEが有利となる。

リボソームを介したトランスフェクションに使用する好ましい組成物は、DOTAP（N-〔1-（2,3-ジデオイロキシ〔dideoxyloxy〕）プロピル〕-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート）で、これは市販で入手可能である。CPEは直接観察が可能な現象で、位相差顕微鏡で評価することができる。CPEは、初めに溶菌感染した細胞が収縮し、最後には溶菌プラークが形成されるアデノウイルスの細菌毒性の形態的特徴を示したものである。この方法固有の利点としては、インキュベートを開始して10日～14日後に、ウイルスの増殖が容易に測定できることである。これは、リン酸カルシウムを介したトランスフェクションと、その後のプラーク検定との組合せでは、少なくとも14日、普通は最低21日、時として数週間経たないと結果を評価できないのと比較すると著しい改善である。

ある実施態様では、E1が欠けているプラスミドと293細胞の組合せで例示されているように、本発明の方法を、複製欠損性アデノウイルスプラスミドとこの欠陥を相補する宿主細胞の組合せに使用している。機能的E1AとE1Bが欠けているアデノウイルスプラスミドに、p53発現領域を組み込んで、本発明の実用実施例として使用することができるが、この同じ方法によってどのような発現領域でも組換えアデノウイルスに取り入れることもできる。正確な方法の実施態様は所望によって異なるが、ある場合では最小必須培地を使用することが好ましい。

これらの新しい方法をPCR解析と併用して、正しく組換えられたウイルスが存在しているか、否かを確認することができる。PCRは当業者に公知であって、アメリカ合衆国特許第4,683,195号に開示されている。この特許は引用することにより本発明の一部とする。PCRを本発明と併用する場合、細菌変性効果を示す

細胞の上澄み液からDNAを採取し、1組は発現ベクターに特異性を持ち、他の1組はアデノウイルスゲノムに特異性を持つ2組のプライマーを用いてPCRに

よりこのDNAを解析する。ベクター、又は挿入断片に特異性を有するDNAは、例えばp53 DNAの発現によってmRNAやタンパク質の産生を示すように、最終的に発現させたいポリペプチド又はRNAをコードするDNAの一部をなす遺伝子セグメントであると定義することができる。また、アデノウイルスゲノムに特異性を有するDNAは、増殖がモニターされている段階の間に発現されるどの部分のゲノムでもよい。

図面の簡単な説明

次に掲げる図面は本明細書を構成する一部であって、本発明の特定の実施態様をさらによく説明するために掲載したものである。以下に開示する特定の実施態様の詳細な説明と、これら図面のうち一以上を併せて参照すれば、本発明をよく理解することができる。

図1は、組換えp53アデノウイルスの産生のための図である。p53発現カセットをpXCJL.1のXbaI部位とClaI部位の間に挿入した。p53発現ベクター(pEC53)と組換えプラスミドpJM17を、293細胞中に同時トランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、細胞変性効果が始まるまで培地に維持された。新しく産生されたp53組換えアデノウイルス(Ad5CMV-p53)は、CPE上澄み液をプロテイナーゼKで処理し、フェノールで抽出して作成したDNAテンプレートを用い、DNAをPCRで解析することにより同定した。

図2Aは、Ad5CMV-p53 DNAの構造解析に使用した地図を示している。これは、p53発現カセットの位置、PCRプライマー及び制限部位を示す、Ad5CMV-p53ゲノムDNAの地図である。ゲノムの大きさは約35.4 kbで、100図単位 (maps unit) (1 m.u. = 0.35 kb) に目盛りを付け

ることができる。p53発現カセットは、Ad5ゲノムのE1領域(1.3~9.2 m.u.)を置換した。プライマー1は、ヒトCMV主要IE遺伝子プロモーターの第一イントロンの下流に位置している。プライマー2は、SV40初期ボリアデニル化シグナル中に位置している。両プライマーとも両端は、p35cD

NA挿入断片から15～20bp離れて、1.40kbのPCR産物の周囲を定めている。プライマー3と4とは、Ad5ゲノムから各々11m.uと13.4m.u.に位置し、0.86kbのウイルスゲノム特異的PCR産物の周囲を定めている。

図2Bは、PCR産物のアガロースゲル解析を示している。各々の反応では、1.4kb(p53)と0.86kbの(Ad5)DNAフラグメントを定めている2組のプライマーを使用した。各々の反応に使用したDNAテンプレートは、pEC53プラスミド(レーン1)、Ad5/RSV/GL2DNA(レーン2)、DNAなし(レーン3)及びAd5CMV-p53DNA(レーン4)であった。レーン(M)は分子量マーカーに対応している。

図2CはAd5CMV-p53DNAの制限地図を示している。CsCl勾配で精製したAd5CMV-p53DNAのサンプルを、各々、酵素なし(U)、Hind III(H)、BamHI(B)、EcoRI(E)、及びClaIで消化して、1%アガロースゲルで解析した。レーン(M)は分子量マーカーである。

図3A、3B、3C、及び3Dは、293における組換えアデノウイルスによる細胞変性効果の観察結果を示している。また、図3A、3B、3C、及び3Dは、293細胞の一連の位相差画像(×400)である。さらに、図3A、3B、3C、及び3Dは、一頁の画像を4パネルに分けたものである。図3Aはトランスフェクション前、図3Bはトランスフェクション後12日のネガティブコントロール、図3Cはトランスフェクション後12日のCPEを開始したもの、図3Dはトランスフェクション後14日のCPEを完了したものである。

図4A、4B、4C、及び4Dは、組換えアデノウイルスに感染した細胞の免疫組織化学像を示している。図4A、4B、4C、及び4Dは、H358細胞の一連の免疫組織画像である。また、図4A、4B、4C、及び4Dは、一頁の画像を4パネルに分けて、H358細胞に対するAd5CMV-p53の感染力を示したものである。Ad5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2をH358細胞に、50PFU/細胞で24時間感染させた。また、培地のみを使用した

ものを偽感染 (mock infection) として使用した。感染させた細胞は、免疫染色により解析した。図4Aは、偽感染を抗p53抗体でプローブした結果を示している。図4Bは、細胞をAd5/RSV/GL2コントロールに感染させて、抗p53抗体でプローブした結果を示している。図4Cは、Ad5CMV-p53に感染させた細胞を、無関係の抗体 (MOPC-21) でプローブした結果を示している。図4Dは、Ad5CMV-p53に感染させた細胞を、抗p53抗体でプローブした結果を示している。使用した抗p53抗体は、Pab1801であり、染色にはアビジン-ビオチン法を用いた。

図5Aでは、クーマシーブルーで染色したSDS-PAGEにより、H358細胞中で発現した外因性p53の相対濃度を比較したものである。H358細胞のサンプルは、Ad5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2に30PFU/細胞で感染させて、感染24時間後及び72時間後でサンプルとして調製した。SDS-PAGE解析のクーマシーブルー染色によると、ロードされたタンパク質サンプルの相対量を示すことができる。レーン1と4は、Ad5/RSV/GL2に感染させた細胞のサンプルである。レーン2と3は、異なる2つのAd5CMV-p53株それぞれに感染させた細胞から、感染24時間後採取したサンプルである。レーン5と6は、Ad5CMV-p53に感染させた細胞から、感染72時間後採取したサンプルである。レーン7は、感染72時間後で採取した偽感染H358のサンプルである。レーンMは、予め染色したkDa単位の分子

量マーカー (GIBCO-BRL) である。

図5Bは、レーン配置を図5AのSDS-PAGEの場合と同様にして、ウェスタンブロット法で解析した結果を示している。抗p53抗体を用いてウェスタンブロット法でp53発現の相対濃度を解析した。使用した一次抗体は、p53タンパク質 (PAb 1801, Oncogene Science Inc.) と β アクチン (Amersham, Inc.) に対するモノクローナル抗体であった。ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合した2次抗体とECL発色剤は、ウェスタンブロット法でウイルス感染させたH358細胞をAmersham Inc. から入手した。5Bのウェスタンブロット

法の構成と規模は5Aと同一である。

図6は、ウェスタンブロット法で測定したp53発現の時間経過を示している。H358細胞を多数の皿に入れ、IOPFU/細胞でAd5CMV-p53に感染させた。感染後の指定時点で細胞ライセートを調製した。ウェスタンブロットを抗p53抗体と抗アクチン抗体とで同時にプローブした。レーン“C”はネガティブコントロールを示している。棒グラフはデンストメーターで測定したp53の相対量を示している。

図7Aは、細胞系H358のウイルス感染ヒト肺癌細胞の成長曲線である。細胞は、皿一枚(60mm)あたり細胞数 10^5 個、1細胞系あたり6皿の割合で接種した。24時間後、10MOI (multiplicity of infection、多重感染度、即ちPFU/細胞)のAd5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2に感染させた。感染後6日間、毎日細胞数を数えた。これらの成長曲線は、実験を4回繰り返して得たデータから作成した。

図7Bは細胞系H322由来の、ウイルス感染ヒト肺癌細胞の成長曲線である。細胞は、皿一枚(60mm)あたり細胞数 10^5 個、1細胞系あたり6皿の割合で接種した。24時間後、10MOI (多重感染度、即ちPFU/細胞)のAd5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2に感染させた。感染後6日間、毎日

細胞数を数えた。これらの成長曲線は、実験を4回繰り返して得たデータから作成した。

図7Cは細胞系H460由来の、ウイルス感染ヒト肺癌細胞の成長曲線である。細胞は、皿一枚(60mm)あたり細胞数 10^5 個、一細胞系あたり6皿の割合で接種した。24時間後、10MOI (多重感染度、即ちPFU/細胞)のAd5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2に感染させた。感染後6日間、毎日細胞数を数えた。これらの成長曲線は、実験を4回繰り返して得たデータから作成した。

図8は同所性肺癌モデルによるAd5CMV-p53実験のフローチャートを示している。これはH226Br細胞とウイルスを接種したヌードマウスを治療

する実験で、投与量と治療計画の概略をフローチャートとして示したものである。

。

図9A、9B、9C、及び9Dは、治療マウスとコントロールマウス各々から切除した、肺と中隔膜のサンプルである。図9A、9B、9C、及び9Dは、一頁の画像を4パネルに分けたものである。治療後6週間が経過した最終日において、マウスを殺した。肺と中隔膜の組織を切除して、腫瘍形成を評価した。図9Aは、正常ヌードマウスの中隔膜ブロックのサンプルである。図9Bは、ビヒクル(PBS)で治療したマウスの中隔膜ブロックのサンプルである。図9Cは、Ad5CMV-p53で治療したマウスの中隔膜ブロックのサンプルである。図9Dは、Ad5/RSV/GL2で治療したマウスの中隔膜ブロックのサンプルである。矢印は腫瘍塊を示している。

最良の実施態様の詳細な説明

A. 肺癌発生の分子事象

本発明者らは実験を行い、癌が発生及び進行する重要な分子事象を同定した。この結果、本発明者らは、in vivoで特定の正常なタンパク質機能を回復することにより、悪性表現型を抑制する新しい方法を開発することができた。

最も発生頻度が高い肺癌組織(80%)を、非小細胞肺癌(non-small-cell lung cancer)(NSCLC)の名称で分類し、これに鱗状癌(squamous)、腺癌(adenocarcinoma)、及び大細胞未分化癌(large-cell undifferentiated)を含めた。現在のところ、肺癌の分子生物学のデータの多くは、発生頻度が低い小細胞肺癌(small-cell lung cancer)(SCLC)の研究から得られたものである。SCLCとNSCLCとは、細胞の神経分泌の特徴によって区別することができる。SCLCは化学療法によく反応するが、治療後速やかに再発する。NSCLCは、上記以外の発癌物質が誘発する上皮癌のモデルとしても用いることができる。この実験で開発されたアプローチや観察は、その他のタイプの上皮癌にも適用することもできる。

悪性形質転換の過程には、遺伝的パラダイムが介在していることを示す数多くの証拠が集められている。癌細胞で検出される主な障害は、優性ガン遺伝子や、

優性ガン抑制遺伝子に存在している。優性ガン遺伝子は、原ガン遺伝子と呼ぶクラス遺伝子に変化したもので、シグナルトランスダクションや転写を含む重要な正常細胞機能に関与している。形質転換を起こす能力を与える優性ガン遺伝子の一次的修飾は、点突然変異、転座、転位、及び増幅を含む。ガン抑制遺伝子では、突然変異や欠失あるいはこれらの併合にによって、機能をホモ接合で喪失すると、形質転換が起こると思われる。ガン抑制遺伝子の一部は転写の調整によって、増殖を制御する役割を果たしているように思われる。優性ガン遺伝子やガン抑制遺伝子の発現が変化すると、細胞の一部の特性に影響が出てきて、悪性表現型の誘因となる可能性もある。

これまで、ガン遺伝子が仲介する形質転換のメカニズムがより良く知られるようになって来ているにも拘らず、ガン遺伝子とその産物を特異的に標的とする療法の開発はほとんど進歩しなかった。当初、この分野の研究では、先ず優性ガン遺伝子の特徴付けがなされたこともあって、焦点がこの優性ガン遺伝子に充てら

れていた。DNAを介する遺伝子の伝達が研究されるようになって、先ずヒト悪性腫瘍からDNAが転移し、その後で正常細胞が悪性表現型を獲得することが立証された。

B p53と、癌におけるp53の突然変異

現在、p53はガン抑制遺伝子であると認識されている (Montenarch, 1992)。化学物質による発癌、紫外線照射、及びSV40を含むいくつかのウイルスにより形質転換した多くの細胞に、高濃度のp53が見いだされている。p53遺伝子は、広範囲に亘る各種ヒト腫瘍において、突然変異によって失活している場合が多く、発生頻度が高いヒトの癌で突然変異することが最も多い遺伝子であると既に報告されている (Mercer, 1992)。p53遺伝子はヒトNSCLCの50%以上 (Hollestein et al., 1991)、及びこれ以外の広範囲の腫瘍において突然変異している。

p53遺伝子は、ラージT抗原やE1Bなどの宿主タンパク質と複合物を形成することができる375個のアミノ酸からなるリンタンパク質をコードしている。このタンパク質は正常組織や正常細胞で見いだされるが、形質転換した細胞や

、腫瘍組織と比較すると僅かな濃度でしかない。興味深いことに、野生型 p 5 3 は細胞の成長や細胞分裂を調整する上で重要であると思われることである。ある症例では、野生型 p 5 3 の過剰発現に、ヒト腫瘍細胞系において抗増殖効果があったことが示されている。したがって、p 5 3 は細胞の増殖に対してネガティブレギュレーターとして作用することができるし (Weinberg, 1991)、制御できない細胞の増殖を直接的に抑制したり、あるいは制御できない増殖を抑制できる遺伝子を間接的に活性化することもできる。したがって、野生型 p 5 3 が存在していなかったり不活性化していると、形質転換を起こす一因となる可能性もある。しかしながら、ある研究では、突然変異 p 5 3 遺伝子の形質転換する潜在性能が完全に発現するためには、突然変異 p 5 3 が存在することが必要であると報告して

いる。

野生型 p 5 3 が多くの細胞系において中枢的に重要な増殖調整遺伝子であると認識されているが、この遺伝子の遺伝的特性や、生化学的特性にも役割があるように思われる。ミスセンス突然変異は、p 5 3 遺伝子によく起こるが、ガン遺伝子の形質転換能にとっても必須な突然変異である。点突然変異に誘発された単独の遺伝的变化は、p 5 3 ガン遺伝子を生じうる。しかしながら、他のガン遺伝子とは異なり、p 5 3 の点突然変異は少なくとも 3 0 個のそれぞれ異なるコドンで存在することで知られている。これらの点突然変異は、ホモ接合を減らすことなく、細胞の表現型を転換させる優性対立遺伝子を作り出すことが多い。さらに、これらドミナントネガティブな対立遺伝子の多くは生物中では寛容され、生殖細胞系中に受け継がれる。各種対立遺伝子は、最小限の機能不全をもつ負の対立遺伝子から、強い浸透度のドミナントネガティブな遺伝子まで、広い範囲に亘っている (Weinberg, 1991)。

Caseyらは、野生型 p 5 3 をコードしているDNAを、二つのヒト乳癌細胞系にトランスフェクションすると、これらの細胞が増殖を抑制する制御を回復すると報告している (Casey et al., 1991)。また、突然変異 p 5 3 ではなく、野生型 p 5 3 をヒト肺癌細胞系にトランスフェクションしても同様な効果が得られた

ことが報告されている (Takahasi et al., 1992)。p53は、変異遺伝子よりも優性で、変異遺伝子と細胞中に同時トランスフェクションすると、増殖に拮抗する選択がなされる。トランスフェクションされたp53が正常に発現しても、内因性p53を持つ細胞の増殖には影響しない。したがって、正常細胞が上記のような構成物を取り込んでも、副作用はない。

したがって、p53に起因する癌を野生型p53で治療して、悪性腫瘍細胞数を減らすことは可能である。しかしながら、DNAトランスフェクションによって患者の体内の癌細胞にDNAを導入することは不可能であるので、上記の研究

がその目的を達成するまでには、まだまだ長い距離を行かなくてはならない。

C. 遺伝子療法の技術

遺伝子療法について今日までいくつかの実験アプローチが提案されているが、それぞれ特有の欠点がある (Mulligan, 1993)。上記したようにトランスフェクション法は、DNAに実験対象の遺伝子を含有させて、生物的にではなく、例えば物理的又は化学的に細胞膜を浸透することにより細胞内に導入することが基本となっている。このことからこのアプローチは、一時的に体外に取り出すことができ、治療由来の細胞毒性を寛容できる細胞、すなわちリンパ球に限られてしまう。また、ある脂質や両親媒性ペプチドからリポソーム又はタンパク質結合体をつくって、トランスフェクションに使うことはできるが、遺伝子組込みの効率が低く、細胞1,000～100,000個当り組込み成功例1件程度でしかない。そればかりでなく、トランスフェクションされた遺伝子の発現持続時間は、増殖性細胞で数日間、非増殖性細胞で数週間に過ぎないことが多い。したがって、DNAトランスフェクションは明かに癌治療方法として適当ではない。

第二のアプローチは、それぞれのウイルスが独自の遺伝子材料を持参して、細胞に入っていくことができるウイルスの天然の性能を利用する方法である。独自の遺伝子を宿主ゲノムに取り込ませ、多量の外来遺伝材料を伝達し、広範囲の種と細胞型に感染でき、その上特別の細胞系でパッケージングされることができる性能を持つレトロウイルスは、遺伝子デリバリーベクターとして有望ではある。しかしながら、三つの重要な問題があって、レトロウイルスベクターの実用を阻

んでいる。第一に、レトロウイルスの感染力は、標的表面のレトロウイルス受容体の存在量しだいであるということである。第二に、レトロウイルスが効率的に取り込まれるのは、複製している細胞だけである。最後は、レトロウイルスは濃縮及び精製が難しいことである。

D. 遺伝子療法に用いるアデノウイルス構成物

ヒトアデノウイルスは、二本鎖DNA腫瘍ウイルスで、ゲノムの大きさは約36 kbである(Tooza, 1981)。アデノウイルスはこれまでに、真核細胞遺伝子発現のモデルシステムとして広く研究され、特徴もよく調べられて、遺伝子伝達システムとして開発するのに魅力的な系である。この群のウイルスは、*in vitro*、*in vivo*ともに、増殖と操作が容易で、宿主域が広い。溶菌感染細胞では、アデノウイルスは宿主のタンパク質合成を停止し、宿主のメカニズムに多量のウイルスタンパク質を合成させて、おびただしいウイルスを産生する。

ゲノムのE1領域にはE1AとE1Bがあつて、ウイルスのゲノム及びいくつかの細胞遺伝子の転写調節を行うタンパク質をコードしている。E2発現遺伝子にはE2AとE2Bとがあつて、ウイルスの複製機能、例えば、DNA結合タンパク質、DNAポリメラーゼ、及び複製の準備をする末端タンパク質の合成を可能にしている。E3遺伝子産物は、細胞障害性T細胞や腫瘍壊死因子による細胞分解を防止するので、ウイルスの増殖に重要であると考えられる。E4タンパク質に関連する機能には、DNA複製、後期遺伝子発現、及び、宿主細胞の閉止(host cell shutoff)がある。後期遺伝子産物にはビリオンキャプシドタンパク質のほとんどが含まれていて、主要後期プロモーターからつくられる1個の一次転写産物のプロセッシングの大部分が起こった後に初めて、これらの後期遺伝子産物が発現する。主要後期プロモーター(MLP)は、感染後期の段階で高い効率を発揮する(Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991a)。

ウイルスのゲノムは、*in cis*では少量しか必要とされないので(Tooza, 1981)、アデノウイルス由来のベクターと293細胞などの細胞系とを同時使用すると、このベクターが大きなDNAフラグメントを置換する優れた性能が生まれる。また、Ad5で形質転換したヒト胚腎臓細胞系(Graham, et al., 1977)は、

in transに必須のウイルスタンパク質を供給するように開発されてきた。したがって、本発明者らは、このような特性からin vivoで癌細胞を標的とするには、アデノウ

イルスを使うのがよいと判断した (Grunhaus & Horwitz, 1992)。

細胞に外来タンパク質をデリバリーするアデノウイルスシステムの特筆すべき利点としては、(i) 外来DNAによって比較的大きなウイルスDNAを置換することができる、(ii) 組換えアデノウイルスの構造が安定している、(iii) ヒトにアデノウイルスを投与しても安全である、及び(iv) アデノウイルスによる感染と癌又は悪性腫瘍との間で、知られている関連性がない、(v) 高力価の組換えウイルスを得ることができる、(vi) アデノウイルスの感染度が高いことが挙げられる。

この他、レトロウイルスに勝るアデノウイルスベクターの利点として、高濃度の遺伝子発現を挙げることができる。さらに、アデノウイルスの複製は、レトロウイルスの配列とは異なり、宿主の遺伝子複製に依存しない。E1領域におけるアデノウイルスの形質転換遺伝子は、容易に欠失でき、効率的な発現ベクターとなるので、アデノウイルスベクターに起因するガン遺伝子の危険は無視できる程小さいと考えられる (Grunhaus & Horwitz, 1992)。

一般に、アデノウイルス遺伝子伝達システムは、E1などゲノムの一部を欠失させて複製欠損性 (replication-incompetent) とするが、感染適格性は保持するように操作した、組換えアデノウイルスを基本としている。アデノウイルスゲノムから別の部分をさらに欠失させると、相対的に大きな外来タンパク質を発現することができる。例えば、E1とE3両方の領域を欠失しているアデノウイルスは、10 kbまでの外来DNAを担持して、293細胞内で高力価になることができる (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991a)。驚くべきことに、アデノウイルスによる感染後、導入した遺伝子 (トランスジーン) が発現を続けていたことが報告されている。

最近では、真核細胞や動物全体に遺伝子を伝達する仲介手段として、アデノウイルスを介する遺伝子の伝達が研究されるようになった。例えば、まれな劣性遺

伝疾患であるオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠乏症を罹患しているマウスの治療において、アデノウイルス構成物を用いて正常なOTC酵素を供給できることが見いだされた。残念ながら、17症例のうち正常濃度のOTCを発現できるまで回復したものは4例に過ぎなかった（Stratford-Perricaudet et al., 1991b）。したがって、この実験のマウスの大部分は、欠陥が部分的に矯正されただけで、生理的にも、表現型でも変わるところはなかった。このような結果では、癌療法にアデノウイルスベクターの使用が促進される筈がない。

コットンラットの嚢胞性線維症の膜内外伝導調整遺伝子（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator、CFTR）の遺伝子を、アデノウイルスによって肺上皮に伝達する実験が行われた。この実験は部分的には成功したが、実験動物の上皮に伝達された遺伝子の生物活性を評価することはできなかった（Rosenfeld et al., 1992）。この実験でも、遺伝子が伝達されたこと、肺気道細胞でCFTRタンパク質が発現したことは証明されたが、生理的効果は証明されなかった。1991年のScience 誌の論文において、Rosenfeldらは、 $\alpha 1$ -抗トリプシンタンパク質を肺で発現させることに成功したが、生理的効果を証明することができなかったことを報告している。事実、彼らは観察された発現の濃度は、ヒトの肺の保護に必要な濃度の約2%、つまり、生理的効果に必要な濃度を大幅に下回ると見積ったのであった。

正常ラットの肝臓にヒト $\alpha 1$ -抗トリプシン遺伝子を肝門内注射により導入する実験が行われた。その結果、遺伝子は肝臓で発現し、導入されたヒトタンパク質がラットの血漿に分泌された（Jaffe et al., 1992）。しかし、残念ながら、得られた濃度は治療価値に達する程高くはなかった。

これらの実験結果では、アデノウイルスが組換え細胞中で十分なタンパク質を発現させて、生理的に妥当な効果を挙げることを証明できなかったし、また、アデノウイルスシステムが癌療法に使用できる有用性を持つことも証明できなかった。

さらにまた、本発明以前では、p53には毒性があるので、アデノウイルスを製造する場合に用いられるような、パッケージング細胞にp53を取り入れることはできないと思われていた。また、アデノウイルスのE1Bは、p53と結

合するので、この点からもアデノウイルスの技術と、p53の技術とを結び付けることはできないと考えられていたのである。

E. p53-アデノウイルス構成物と腫瘍の抑制

本発明は、癌の遺伝子療法に、新しく効果的なガン抑制ベクターを提供するものである。この組換えウイルスは、高力価である、標的範囲が広い、効率的に形質導入ができる、標的細胞に組み込まれることがないなどの、アデノウイルスベクターとしての長所を活用しようとするものである。本発明の一実施態様においては、増殖欠損性であり、ヘルパーに依存性がない、アデノウイルスをつくり、ヒトサイトメガロウイルスプロモーターの制御下で野生型p53 (Ad5CMV-p53) を発現している。

発現ベクターの制御機能は、哺乳動物の細胞中で発現しようとする場合には、ウイルスから与えられることが多い。例えば、広く使用されているプロモーターはポリオーマ、アデノウイルス2、及びサルウイルス40 (SV40) から派生されるものである。SV40ウイルスの初期及び後期のプロモーターは、両方ともSV40ウイルスの複製開始点を含有するフラグメントとして容易にウイルスから得ることができて、特に有用である。SV40のフラグメントは、ウイルス複製開始点に位置するHindIII部位からBglI部位の方向に伸びている約250bpの配列を含んでいさえすれば、小さくとも、大きくとも、どちらでも使用するのに差し支えはない。さらに、プロモーター配列や制御配列は、制御配列が宿主細胞のシステムと適合すれば、通常は、含まれている遺伝子配列と結合したままで使用することができるし、また、その方が望ましい。

複製開始点は、SV40あるいは他のウイルス（例えば、ポリオーマ、アデノVSV、BPV）から派生されるような外因性の開始点を含むベクターを構成して得ることができるし、また宿主細胞の染色体複製メカニズムから得ることもできる。ベクターが宿主細胞の染色体に組み込まれている場合には、それで充分である場合が多い。

好ましいp53アデノウイルスの増殖デザインは図1の図表にしてある。これ

について、組換えアデノウイルスの増殖及び同定の改良プロトコルが開発されている（以下で説明する）。同定後、図2に示すようなPCR解析によりp53組換えアデノウイルスの構造を確認した。この構造を単離して確認した後、このp53アデノウイルスを使って、ホモ接合p53遺伝子を欠失させたヒト肺癌細胞系H358に感染させた。ウェスタンブロット法により、この外因性p53タンパク質が高濃度で発現し（図4及び図5）、感染3日後でピークに達したこと（図6）が認められた。

さらにまた、p53が点突然変異している細胞系H322において、変異しているp53が外因性p53の発現によって負の調節を受けていることが示された。実験コントロールとしては、構造がAd5CMV-p53と似ているビリオン（Ad5/RSV/GL2）を使用した。このビリオンは、ラウス肉腫LTRプロモーターによって制御されたルシフェラーゼcDNAをビリオンの発現カセット中で含有していた。ビリオンAd5/RSV/GL2に感染させた細胞中では、p53が発現したことも検出されなかったし、アクチンの発現が変化したこととも検出されなかった。Ad5CMV-p53に感染させたH358細胞の増殖は、非感染細胞又はコントロールビリオンに感染させた細胞とは対照的に、大幅に阻害された（図7A）。p53ビリオンにより、H322細胞の増殖もまた大幅に阻害されたが（図7B）、野生型p53を含有するヒト肺癌H460細胞では影響が少なかった（図7C）。

in vitroにおいて、肺癌細胞の増殖に対して、Ad5CMV-p53の仲介に

よる強力な抑制効果が認められた。MOIが1PFU/細胞以下のAd5CMV-p53で細胞を感染させた場合、増殖抑制はそれほど明らではなかった。ところが、MOIが100PFU/細胞以上であると、コントロールウイルスであるAd5/RSV/GL2においてさえ細胞毒性が認められた。本発明者らの研究において、成長速度実験で用いた至適用量は、10～50PFU/細胞であった。この用量範囲ならば、細胞増殖の抑制はp53タンパク質の発現によるものであるとすることができた。

ヌードマウスを用いる実験において、H358細胞をAd5CMV-p53で

処理することによって、腫瘍形成を大幅に抑制したことが認められた。ヒトの同所性肺癌のマウスモデルにおいて、ウイルス処理の3日前に、p53が点突然変異している腫瘍形成性H226Br細胞を気管支内に接種した。このモデルシステムにAd5CMV-p53を気管支内滴注することにより腫瘍形成を防止した。このことから、修飾されたアデノウイルスは、ヒトの癌細胞内でガン抑制遺伝子の伝達及び発現を仲介する効率的なベクターであり、Ad5CMV-p53ウイルスは、今後さらに癌遺伝子療法で使用する治療剤に開発できることが示唆されている。

ヒト肺癌細胞内でAd5CMV-p53の仲介により、高濃度のp53遺伝子が発現したことがウェスタンブロット法解析で証明されている。外因性p53タンパク質の検出量は、H460細胞の場合では内因性野生型p53の約14倍、H358細胞の場合ではインターナルコントロールであるβアクチンの約2～4倍であった。高濃度で発現された理由は、(1) 遺伝子の伝達が非常に効率的であった、(2) 強力なCMVプロモーターがp53cのDNAを発現させた(3) アデノウイルスE1エンハンサーがp53のcDNAの転写を増強したことが挙げられる。感染後のp53発現の持続時間は、H358細胞の場合15日以上であった。しかしながら、感染5日後以降では発現が急速に減衰した。感染H35

8細胞からDNAサンプルを採取してPCR解析を行ったところ、タンパク質濃度が低下するにつれて、ウイルスDNAの濃度も低下することが認められ、in vitroでは癌細胞が増殖を続けている間中、ウイルスのDNAが失われていくことを示していた。

従前から宿主細胞が仲介してCMVプロモーターが閉止する(CMV promoter shutoff)現象が報告されていたことから、p53の発現を制御しているCMVプロモーターが細胞内で減衰するのでp53の発現も低下して行くとも考えられる(Dai et al., 1992)。アデノウイルスベクターは、宿主遺伝子に組み込まれない遺伝子伝達ベクターである。したがって、遺伝子発現の持続時間は、宿主細胞、伝達される遺伝子、及び関連するプロモーターを始めとする多数の要因に依存

している。Crystalらは感染6週間後においてすら、コットンラットの上皮細胞における嚢胞性腺維症の膜内外伝導調整遺伝子が低濃度の発現をしているのを証明した(Rosenfeld et al., 1992)。また、Perricaudetの研究所では、mdxマウスの筋肉のミニジストロフィンが感染後3ヶ月以上も最低限度の発現を続けていたことを証明した。本実験で観察されたように、野生型p53タンパク質が高濃度で短時間発現することにより、Ad5CMV-p53によってin vivo処理した後では、副作用が少ないという利益効果が生まれる。

本明細書で開示した実験では、p53組換えアデノウイルスは、腫瘍細胞がp53タンパク質の機能を回復するためと考えられる腫瘍抑制特性を持つことを示している。これらの実験結果は、Ad5CMV-p53ビリオンを癌治療の治療剤として使用することを支持している。

F. 組換えアデノウイルス増殖同定の改良プロトコル

新しい遺伝子伝達システムとしての組換えアデノウイルスには、遺伝子療法やワクチンの開発の多くの面で適用される可能性がある。このような分子生物学の分野では、組換えアデノウイルスの増殖が重要な用具である。組換えアデノウイ

ルスの現在の増殖方法は、リン酸カルシウム沈澱を仲介として293細胞内にトランスフェクションした後、トランスフェクションした細胞をプラーク検定することからなる。この方法のトランスフェクションの効率には改良する余地があり、また、操作手続きもより簡単化する必要がある。

本発明以前では、組換えアデノウイルスの増殖は、常套的にリン酸カルシウムを介してトランスフェクションを行うことにより実施されてきた。この方法は細胞を、リン酸カルシウム中でベクター又はプラスミドDNAに数時間さらした後、例えば、15%グリセロールに1分間つけるなど、短時間のショック処理を行うことからなる。この方法は細胞に取り入れられるDNAの濃度が低い、つまり極めて効率の悪いトランスフェクション手段であるという著しい欠点がある。ウイルスが増殖したことは、ウイルスの増殖に起因する細胞溶解を示す、溶解した細胞の周囲に、清澄な丸い区域となっているプラークが見えることで判断することができ

本発明者らは、トランスフェクション効率を著しく向上し、選択も簡単化にできる新規なアデノウイルス製造方法を開発した。本発明者らは、DOTAPを介するトランスフェクションなどの、リボソームを介するトランスフェクションと、細胞変性効果（CPE）の観察とを組み合わせると、効率は向上し、検出も迅速で簡単化できることを見いだした。新方法では、リボソームDOTAPを介して遺伝子を伝達して、発現ベクターと組換えプラスミドを293細胞中に形質導入する。このようにしてトランスフェクションされた細胞は、0.5%アガロースで表面処理してプラーク検定するのではなく、そのまま最小必須培地に維持しておいて細胞変性効果（CPE）を観察する。

新方法を用いて、24ウェルプレートのうちウェル2個、及び60mm皿5枚のうち3枚に、同時トランスフェクションして、それぞれ第10日目と第12日目にCPEを発生させる二つの実験を行った。対照として、リン酸カルシウム沈

澱法を用いて、1回当たり60mm皿20枚に同時トランスフェクションさせて、これを3回繰り返したが組換えウイルスを得ることはできなかった。HepG2細胞系とHeLa細胞系にDOTAPが仲介するトランスフェクションを行い、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）解析を実施したところ、CAT活性はリン酸カルシウムトランスフェクションの場合の5倍以上高かった。

同時トランスフェクション後、アガロースによる表面処理をしないことで操作手続きが簡単になった。インキュベート10～14日後では、普通は濁って測定が難しくなるプラークを同定するのではなく、直接CPEを観察するだけであるので、この実験の終了点、つまりウイルスの増殖は、培養後10～14日後に判断が不明瞭で困難であるプラークを確認するかわりに、CPEを直接観察することによってより簡単になった。図3はCPEによる細胞培養と、CPEによらない細胞培養を比較したものである。

本発明者らはさらに、PCRを用いてアデノウイルスの力価を迅速に測定する技術を開発した。この方法はCPEを示す細胞培養物の上澄み液からDNAサンプルを採取して、直接PCR解析を行うものである。この方法では、便宜上、挿

入断片に特異性を持つ配列を増幅するプライマーと、ウイルスゲノムに特異性を持つ配列を増幅するプライマーの2組のプライマーを使用する。本発明者らは、アデノウイルスを細胞培地中に放出しても、僅か約50 μ lの上澄み液でDNAテンプレートを作って、PCRにより検出できることを証明した。

PCR増幅を行った挿入断片に特異性を持つ配列と、ウイルスゲノムに特異性を持つ配列は、例えば、アガロースゲル上でPCR増幅産物を解析することにより同定する。挿入断片に特異性を持つDNAに対応するバンド、ウイルスゲノムに特異性を持つDNAに対応するバンド、及びプライマーに対応するバンドを適当な標準マーカと比較して同定する。

PCRにより、挿入断片に特異性を持つ遺伝子産物と、ウイルスゲノムに特異性を持つ遺伝子産物を増幅する場合には、増幅すべき配列に特異的なプライマーを作成する。挿入断片に特異的な産物の定まった部分を増幅するプライマーと、ウイルスゲノムに特異的な産物のセグメントを定めるプライマーの2組のプライマーを用いれば効果的かつ選択的に増幅を達成することができる。例として、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターとSV40初期ポリアデニル化シグナルから、p53発現カセットを構成した。1組のプライマーは、ヒトCMV主要IE遺伝子プロモーターの第一イントロンの下流に位置し、もう1組のプライマーは、SV40初期ポリアデニル化シグナルに位置している。理想的には、これらのプライマーは両方とも、cDNA挿入断片、つまりこの実施例ではp53から15~20bp離れていることが望ましい。

定められたPCR産物、例えば1.40kbのp53cDNAを選択する。また、例えば、第2組のプライマーはAd5ゲノムから11M.U.及び13.4M.U.に位置して、0.86kbのウイルスゲノムに特異的なPCR産物を定めている。

プライマーの選択は当業者にとり周知である。塩基対配列が分かっているDNA配列の部分を選択して、これを増幅するためのプライマーを構成してもよい。プライマーは、DNAとハイブリッドを形成して、遺伝子の一部分の合成開始部位となる。

ヌクレオチドプライマーは、対合する二本鎖のそれぞれの部位と結合するように設計され、その間に入る配列を増幅すべき部分として定めるようにしてもよい。プライマーとして用いるヌクレオチド分子は、一般に増幅することを所望するDNAセグメントと相補的な、少なくとも10bpの配列を含んでいる。10bpの大きさは、一般的な最低限度で、大きさが10bpより小さいと、ハイブリッド形成が効果的に行えなくなり、安定性に問題が生じる。好ましくは、15～2

0bpの大きさを使用する。本発明の最良の実施態様では、図1に示すプライマーセットを使用しているが、これは19bp又は20bpの大きさである。

G. 患者と治療プロトコル

切除不能な閉塞性気管支内癌などのp53に起因する肺癌患者の細胞に、アデノウイルス-p53遺伝子構成物を局所的にデリバリーすることにより、治療有効遺伝子をデリバリーして臨床疾患を和らげる極めて効果的な方法となる。このアプローチは、最後の癌細胞まで殺すか、除くことを意図している現在の癌療法の顕著な改善である。腫瘍細胞が休眠する現象は立証されており、この減少のために、効果的な殺細胞などあり得るはずがない。

NSCLC細胞がアデノウイルス構成物を取り込むと、この細胞の増殖率が低下する。こうなると患部の肺が広がったまま(expanded)になっている時間が長くなり、気管支内の腫瘍の再増殖を防止することができ、患者が長く生存できるようになる。

切除不能の、気管支内腫瘍が再発し、気道の一部又は全部を閉塞している患者で、体外からの放射線治療に効果がなかったか、放射線治療を受けられない場合には、このプロトコルを考慮する。現在の治療法では、このような病状に対しては一時的な抑えができるだけである。ほとんどの患者では、体外から放射線治療を受けていても、癌は再発する。近接照射カテーテル(brachytherapy catheter)を挿入して、照射療法を追加することもできる。しかしながら、この療法の受診患者の平均寿命は、6ヶ月である。近接照射療法で効果がなかった患者は、遺伝子療法に適格である。この場合、先ずレーザー鉗子又は生検鉗子で気道から腫

瘍を取り除く。これをアデノウイルス構成物の注射と併用すると、注射量を減量することができる。ウイルス構成物の投与をしている場合でも、進行性腫瘍の場合は、他の緩和療法を平行実施してもよい。

次の各種実施例は本発明の最良の実施態様を説明するために記載したものである。

る。当業者は、これらの実施例で開示する技術は、本発明者らが本発明の実施によく機能する技術として発明したもので、したがって、最良の実施態様を構成するものと考えられていることを理解しなくてはならない。しかしながら、当業者は、本開示に鑑み、本明細書で開示された特定の実施態様を数多く変更して、同様の結果を得たとしても、これらの変更は本発明の精神及び範囲内であることを理解しなければならない。

例 1

p 5 3 発現ベクターの構成

本実施例では p 5 3 発現ベクターの構成を説明する。このベクターは次の通りに構成して、アデノウイルス株 A d 5 ゲノムの E 1 領域 (1. 3 ~ 9. 2 m. u.) を置換するのに用い、さらにまた例 2 で説明するアデノウイルスビリオンの構成にも使用する。

図 1 に示す、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (Boshart et al., 1985) 、 p 5 3 c DNA、及び、SV 4 0 初期ポリアデニル化シグナルを含有する p 5 3 発現カセットを、p x C J L 1 (Dr. Frank L. Graham, McMaster University, Canada から恵贈) の X b a I 部位と C l a I 部位との間に挿入した。

ゲノムの大きさは、約 3 5. 4 k b で、これは図単位に換算すると、1 0 0 m u. (1 m. u. = 0. 3 5 k b) となる。p 5 3 発現体カセットは A d 5 ゲノムの E 1 領域 (1. 3 ~ 9. 2 m. u.) を置換した。

プライマー 1 の配列は、5' - G G C C C A C C C C C T T G G C T T C - 3' (配列番号 1) であって、ヒト CMV 主要 I E 遺伝子プロモーター (Boshart, et al., 1985) の第 1 イントロンの下流に位置している。プライマー 2 の配列は、5' - T T G T A A C C A T T A T A A G C T G C - 3' (配列番号 2) で

あって、SV40初期ポリアデニル化シグナルに位置している。これらのプライマー

はいずれも、その両端がp53 cDNA挿入断片から15～20bpだけ離れていて、1.40kbのPCR産物を定めている。プライマー3の配列は、5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3'（配列番号3）、プライマー4の配列は、5'-CATCTGAAGCTCAAAGCGTGG-3'（配列番号4）であって、Ad5ゲノムの各々11m.u.及び13.4m.u.に位置し、0.86kbのウイルスゲノムに特異的なPCR産物を定めている。

例 2

組換えp53アデノウイルスの産生及び増殖

本実施例では、p53を発現する、ヘルパー依存性がない組換えアデノウイルスを産生する好適な方法を説明する。この方法は、アデノウイルスのパッケージングには限りがあるため、pJM17は、自らウイルスを形成できない事実を基本にして、組換えアデノウイルス産生の分子戦略を組み立てている。したがって、トランスフェクションされた細胞内でp53発現ベクタープラスミドと、pJM17とを相同組換えして、必要なアデノウイルスタンパク質を発現する細胞だけに、パッケージングされることができる生ウイルスをつくることができる。

本実施例の方法は、宿主細胞として293細胞を使って、異種DNA発現カセットがE1領域又はE3領域を置換しているウイルスを増殖するものである。この工程では、DNAを293細胞内に同時トランスフェクションする必要がある。ウイルス増殖の効率は、主としてこのトランスフェクションで決められる。本発明以前では、DNAを293細胞にトランスフェクションする方法は、通常、リン酸カルシウム/DNA共沈澱法であった（Graham and van der Eb, 1973）。しかしながら、この方法とプラーク検定法を併用することは比較的難しいし、また、ウイルス増殖の効率が低いのが通例である。本実施例で説明するように、リボソームを介したトランスフェクションを行い、トランスフェクションされた細胞を細胞変性効果（CPE）で同定することにより、トランスフェクションと

その後のトランスフェクションされた細胞の同定を著しく改良させることができる。

293細胞系は、加熱により失活させたウマ血清10%を加えたダルベッコ改良最小必須培地中に維持された。相同組換えするp53発現ベクターと、プラスミドpJM17 (Mcgrory, et al., 1988) とは、メーカーのプロトコル (Boehringer Mannheim Biochemicals, 1992) に従って、DOTAPを介したトランスフェクションにより、293細胞中に同時トランスフェクションした。この概略図を図1に示す。

293細胞 (継代35、60%集密的) は、トランスフェクションの24時間前に60mm皿か、24ウェルプレート of のいずれかに接種した。ウェル各々の細胞は、DOTAPを30 μ l、p53発現ベクターを2 μ g、及びプラスミドpJM17を3 μ gをそれぞれ添加して、トランスフェクションした。トランスフェクション後からCPEの開始まで、2~3日毎に最小必須培地を細胞に供給した。

例 3

組換えアデノウイルスの同定

本実施例では、適当な細胞系で同時トランスフェクションを実施した後、組換えビリオンを同定を確認する新しいポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 検定を説明する。

実験プレートから細胞培養物の上澄み液のアリコート (50~370 μ l) を採取し、プロテイナーゼK (0.5%のSDSと20mMのEDTAを含有する50 μ g/ml) により56℃で1時間処理して、フェノールクロロホルムで抽出し、核酸をエタノール沈澱させた。DNAペレットは20 μ lのdH₂O中に再懸濁して、PCR増幅のテンプレートとして使用した。各種PCRプライマーの相対的位置とその配列を図1に掲げる。これらの配列はそれぞれ、配列番号1、

2、3及び4である。cDNA挿入断片に特異的なプライマーは、1.4kbのPCR産物を定め、ウイルスゲノムに特異的なプライマーは、0.86kbのP

PCR産物を定めている。PCR反応は、 $MgCl_2$ を4mM、KClを50mM、トリトンX-100を0.1%、dNTPsそれぞれ200 μ Mずつ、Tris-HCl (pH9.0)を10mM、プライマーそれぞれ2 μ Mずつ、及びTaqポリメラーゼ (Promega) を1.0単位含有する50 μ l容量内で実施した。反応は、94℃で0.5分、56℃で0.5分、及び72℃で1分、30サイクル行った。

新しく増殖した組換えウイルスの同定方法を簡単化するため、細胞培養物の上澄み液から採取したDNAサンプルを直接PCR検定する検定法を開発した。CPEを起こしている細胞の培地から上澄み液のアリコート (50又は370 μ l) を取り、プロテイナーゼKで処理し、フェノール/クロロホルムで抽出した。エタノール沈澱の後、2組のプライマーを使ってPCR解析を行い、挿入断片に特異的な配列と、ウイルスゲノムに特異的な配列を増幅した。PCRプライマーの標的とその配列を図1に示す。プライマー1、2、3、及び、4は、それぞれ配列番号1、2、3、及び、4で表される。

その結果、1.4kbのcDNA挿入断片と0.86kbのウイルスゲノムフラグメントは、発現ベクター (ポジティブコントロール) と陽性の細胞培養物のDNAサンプルから増幅された (図2 BNそれぞれレーン1及び4)。0.86kbのフラグメントだけが、Ad5/RSV/GL2ウイルス (ネガティブコントロール、レーン2) のDNAサンプルから増幅した。未処理の陽性の細胞培地の上澄み液を取って、PCR反応を行ったが、いずれの場合も増幅されたバンドは現れなかった (レーン3)。

これらの実験結果は、細胞培地の上澄み液を僅か50 μ l使ってDNAテンプレートをつくることにより、細胞培地に放出されたアデノウイルスが検出可能で

あることを示している。また、これらの実験結果から、アデノウイルスの力価を、これまで行われてきたプラーク検定にかわり、この技術によって測定する定量法を開発することができることがわかる。

Ad5 CMV-p53ウイルスDNAをCsCl勾配法により精製して、ジデオキシDNA配列決定法により、これが野生型配列のp53 cDNAであること

を確認した。同様にして、コントロールウイルスであるAd5/RSV/GL2を産生したが、発現カセット中でラウス肉腫ウイルスプロモーターとルシフェラーゼcDNAが使われている以外は、構造がAd5CMV-p53に類似している。大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)を担持する組換えアデノウイルスであるAd5CMV-LacZも、Ad5CMV-p53に類似する構造である。このAd5CMV-LacZは、Dr. Frank L. Grahamから恵贈された。

ウイルス株、力価及び感染。Graham and Prevecの方法(1991)によりブランク精製をおこなって、Ad5CMV-p53、Ad5/RSV/GL2、及び、Ad5CMV-LacZそれぞれのクローンをつくった。1個のウイルスクローンを293細胞で増殖させた。完全な細胞変性効果を示している293細胞の培地を集めて、1000Xgで10分間遠心分離した。上澄み液をプールして、等分し、ウイルス株として-20℃で保存した。ウイルスの力価はプラーク測定法(Graham and Prevec, 1991)により測定した。単層に蒔いた細胞にウイルス溶液(60mm皿毎に0.5ml)を添加して、5分毎に短時間攪拌しながら室温で30分間インキュベートして細胞系を感染させた。その後、培地を添加して、感染細胞を37℃のインキュベーター中に入れた。

H226Br、H322、H460、Hela、Hep G2、LM2や、Veroなどの各種細胞系にAd5CMV-LacZを用いて、組換えアデノウイルスによる遺伝子伝達の効率を評価した。MOIが30PFU/細胞でAd5CMV-LacZに細胞系を感染した後、X-galで染色したところ、すべての細

胞系の97~100%がブルーに染まっていたのが認められた。

例 4

ヒト肺癌細胞においてAd5CMV-p53が

誘導するp53遺伝子の発現

本実施例では、ホモ接合でp53遺伝子が欠失しているヒト肺癌細胞に、組換えp53アデノウイルスを感染させることを説明する。この実験結果では、これ

ら細胞の増殖と変異株 p 5 3 の発現が抑制され、A d 5 C M V - p 5 3 ビリオンが転移細胞の制御に有用な薬剤であることを示していた。

単層にした感染細胞を 3. 8 %ホルマリンで固定し、3 %H₂O₂を含むメタノールで5分間処理したものについて、免疫組織化学解析を行った。この免疫組織化学解析は、Vectastain Elite kit (Vector, Burlingame, CA) を用いて実施した。この解析に用いた一次抗体は、抗 p 5 3 抗体 P A b 1 8 0 1 (Oncogene Science, Manhasset, NY) であった。また、ネガティブコントロールとして M O P C - 2 1 (Organon Teknika Corp., West Chester, PA) を使用した。二次抗体はアビジンで標識した抗マウス I g G (Vector) であった。また、ビオチン化したホースラディッシュペルオキシダーゼ A B C 複合試薬を用いて、抗原抗体複合物を検出した。最後に、細胞を Harris ヘマトキシリン (Sigma) で対比染色して、Cytoseal 60 (Stephens Scientific, Riverdale, NJ) でマウントした。

感染細胞系の免疫組織化学解析を行うことにより、A d 5 C M V - p 5 3 ウイルスの C M V プロモーターに制御される p 5 3 発現の in situ における発現を検討した。ホモ接合で p 5 3 が欠失している H 3 5 8 細胞系では、30 ~ 50 プラーク形成単位 (P F U) / 細胞の多重感染度で、A d 5 C M V - p 5 3 に感染させたとき、免疫組織化学解析で検出したように、p 5 3 遺伝子が効率 97 ~ 100 % で伝達されているのが認められた (図 4)。

ヒト C M V I E プロモーターによって転写された L a c Z 遺伝子を担持しているウイルスである A d 5 C M V - L a c Z で確認した時にも、組換えアデノウイルスによる高い伝達効率が認められた。30 ~ 50 P F U / 細胞の M O I では、H e l a、H e p G 2、L M 2、及び、ヒト N S C L C 癌細胞系を含む、試験されたすべての細胞系の 97 ~ 100 % において、X - g a l 染色法による β - ガラクトシダーゼ活性が陽性であった。アデノウイルスベクターは、遺伝子をヒト癌細胞に伝達する効率的な伝達媒体であることを、これらの実験結果は示している。

単層にした細胞をリン酸緩衝塩類液 (P B S) で洗った後、この細胞を皿に入れて、S D S - P A G E サンプル緩衝液 (60 mm 皿 1 枚当り 0. 5 m l) で

細胞を分解して、全細胞溶解液をつくり、この全細胞溶解液でウェスタンブロット法解析を行った。SDS-PAGE解析では、レーンに細胞 5×10^4 個に等しい細胞溶解液(10~15ml)をロードした。ゲル中のタンパク質はHybond™-ECL膜に移動させた。これらの膜は、0.5%のドライミルクを含むPBSでブロッキングして、一次抗体として、マウスの抗ヒトp53モノクローナル抗体P1801、マウスの抗ヒトβアクチンモノクローナル抗体(Amersham)でプローブし、洗った後、二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼと結合したウサギの抗マウスIgG(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)でプローブした。これらの膜は、Amershamの増強化学ルミネセンスプロトコルにしたがって発色させた。発現した外因性p53の相対量はデンスitometer(Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA)により測定した。

ウェスタンブロット法では、外因性p53タンパク質が高濃度で発現したことを示していた(図5A レーン2、3及び5、6)。タンパク質は感染3日後でピークに達した(図6、挿入断片、0.5日~3日)。コントロールとして、例1の組換えAd5CMV-p53と似た構造を持つビリオンを構成した。このビリオンの発現カセットには、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーターにより制御

されるルシフェラーゼcDNAを含有させた。ビリオンAd5/RSV/GL2に感染した細胞では、p53の発現も検出されなかったし、アクチンの発現の変化も検出されなかった。

組換えp53アデノウイルスを、次の3つのヒト肺癌NSCLC細胞系に感染させた。ホモ接合でp53遺伝子が欠失しているH358細胞系、コドン248でp53遺伝子が点突然変異(GからT)しているH322細胞系、及び野生型p53遺伝子を持っているH460細胞系である。ウイルス感染24時間前、60mm培養皿にH322及びH460(1×10^5)又はH358(2×10^5)を接種した後、これらのヒトNSCLC細胞の成長速度を測定した。細胞は、10PFU/細胞の感染多重度(MOI)で感染させた。さらに、培地を用いて偽感染コントロール(mock infection control)をつくった。このように、異なった処理条件をおこなった3組の各細胞系を培養して、感染後1~6日間細胞数を

毎日計数した。

Ad5CMV-p53に感染したH358は、非感染細胞やコントロールピリオン感染細胞とは対照的に、増殖が大幅に抑制された（図7A）。H322細胞の増殖もp53ピリオンによって大幅に抑制されたが（図7B）、野生型p53を含有するヒト肺癌H460細胞に対する影響は小さかった（図7C）。Ad5CMV-p53ウイルスに感染したH358細胞の79%は、増殖が抑制されたが、非感染細胞とコントロールウイルス感染細胞の増殖は、抑制されなかった。p53が点突然変異をしているH322細胞系の72%は、Ad5CMV-p53によって増殖が抑制されたが、このウイルスの野生型p53を含有するH460細胞系の増殖に対する影響は小さかった（28%が抑制された）。

これらの結果は、p53組換えアデノウイルスは、腫瘍細胞にp53タンパク質の機能を回復させることにより、腫瘍を抑制できることを示している。

実施例 5

p53欠損細胞のAd5CMV-p53による治療

本実施例では、組換えp53アデノウイルスにより*in vivo*で腫瘍細胞に増殖抑制力を回復させて、細胞の悪性増殖又は転移増殖を治療することに関する。本発明の目的であるアデノウイルスを介する遺伝子療法によって、癌を治療する方法を説明する。

10PFU/細胞のMOIで、Ad5CMV-p53及びAd5/RSV/GL2にH358細胞を感染させた。偽感染（mock infection）として、等量の細胞を培地で処理した。感染24時間後、処理した細胞を採取して、PBSで2回洗った。このように処理した細胞は、それぞれ、1匹当たり0.1ml容量に細胞3百万（ 3×10^6 ）個加えたものをヌードマウス（Harlan Co., Houston, TX）に皮下注射した。ウイルスは、それぞれを、マウス5匹づつに投与した。マウスには、注射前に照射（300cGy、 ^{60}Co ）を行い、注射後は毎週検査を行った。腫瘍形成の評価は、6週間の末日に行った。腫瘍の体積は、断面の直径の積の平方根を求め、この平方根を平均直径とする球体を腫瘍の体積と想定して計算した。

Ad5CMV-p53を介した、腫瘍形成に対する抑制効果を測定するため、ヌードマウスにH358細胞（ヒトNSCLC型細胞）を皮下注射して、新生物形成増殖を誘発した。10PFU/細胞でAd5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2に24時間感染させた細胞を、マウスそれぞれに1回注射した。培地のみで処理したH358細胞は、偽感染コントロールとして使用した。偽感染細胞、及びコントロールウイルス感染細胞の場合には、表1に示すように感染14日後で、腫瘍が触知できるようになった。

表1. ヌードマウス^aにおけるH358の腫瘍形成に対するAd5CMV-p53の効果

| 処 理 条 件 | 腫瘍数/マウス数 (%) | 平均体積 (mm ³ ±標準偏差) |
|-------------|-----------------|---------------------------------|
| 培 地 | 4/5 (80) | 37 ± 12 |
| Ad5/RSV/GL2 | 3/4 (75) | 30 ± 14 |
| Ad5CMV-p53 | 0/4 (0) | — |

a H358細胞は処理の上、マウス1匹当たり 2×10^6 個を皮下注射した。腫瘍の大きさは6週間の末日に測定した。

表1に示す通り、Ad5CMV-p53で処理した細胞を投与されたマウスには、腫瘍は形成されなかった。6週間の末日において、腫瘍は直径4～10mmであった。この実験は1群マウス5匹で開始したが、Ad5CMV-p53群、及びAd5/RSV/GL2群の各々1匹のマウスは、恐らく院内感染のため実験終了前に死亡した。

例 6

肺癌治療とAd5CMV-P53

本実施例では、組換えp53アデノウイルスを用いて*in vivo*で腫瘍細胞に増殖抑制力を回復させて、動物の癌を治療することに関する。本発明の目的であるアデノウイルスを介した遺伝子療法によって、癌を治療する方法を説明する。

同所性ヒト肺癌のマウスモデルにより、Ad5CMV-p53の腫瘍形成を抑制する効能をさらに評価した。H359細胞とH322細胞はこのモデルで腫瘍

を形成しなかったので、H226Br細胞系を使用した。この細胞系の由来は肺鱗状癌 (squamous lung cancer) で、肺から脳へ転移したものである。また、このH226Brは、p53遺伝子のエクソン7、コドン254で点突然変異 (ATCからGTC) していて、マウスにおいて腫瘍形成性である。

同所性ヒト肺癌のマウスモデルの試験方法は、前報により報告されていた (Georges, et al., 1993)。簡単に言うと、ヌードマウスを放射線処理 (300 cGy、 ^{60}Co) して、H226Br細胞を気管支内滴注により接種した。滴注量はマウス1匹当たり、0.1ml容量のPBSに細胞 2×10^6 個を添加したものを投与した。接種3日後、1群当たり10匹のマウスにウイルス又はビヒクル (PBS) 0.1mlを1日1回、2日間気管支内滴注した。この時のウイルス投与量は、マウス1匹当たり 5×10^7 個のAd5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2であった。マウスは6週間の末日に殺した。肺組織及び中隔膜組織を切除して、腫瘍の大きさを測定することにより腫瘍形成を評価した。腫瘍塊の切片を組織学的に解析して、腫瘍であることを確認した。

ヌードマウスを照射した後、H226Br細胞をマウス1匹当たり 2×10^6 個、気管支内滴注により接種した。接種3日後、マウスそれぞれに (1群当たり8～10匹) Ad5CMV-p53又はAd5/RSV/GL2又はビヒクル (PBS) のいずれか0.1mlを1日1回、2日間気管支内滴注した。ウイルス投与量は、マウス1匹当たり 5×10^7 PFUであった。6週間の末日に、肺組織と中隔膜組織を切除して、腫瘍の大きさを測定することにより、腫瘍形成を評価した。この試験方法のフローチャートを図8に示し、切除した代表的なサンプルを図9に掲げる。検出した腫瘍は、組織学的な解析により確認した。腫瘍の寸法データを表2に示す。

表2. 同所性ヒト肺癌^aのマウスモデルにおけるH226Brの腫瘍形成に対するAd5CMV-p53の効果

| 処 理 条 件 | 腫瘍マウス数/ マウス全数 (%) | 平均体積 (mm ³ ±標準偏差) |
|-------------|----------------------|---------------------------------|
| ビヒクル | 7/10 (70) | 30 ± 8.4 |
| Ad5/RSV/GL2 | 8/10 (80) | 25 ± 6.9 |
| Ad5CMV-p53 | 2/8 (25) | 8 ± 3.3 ^b |

a マウスには、1匹当りH226Brを 2×10^6 個、気管支内に接種した。接種3日後、ビヒクル又はウイルスのいずれかを(1匹当り、1mlに 5×10^7 個)、1日1回、2日間気管支内投与した。6週間後の末日に、腫瘍形成を評価した。

b ビヒクル(PBS)コントロール群又はウイルスコントロール群と比較した時のバラツキを二元的に解析した標準偏差である $p < 0.05$ 。

Ad5CMV-p53で治療したマウスのうち、腫瘍を形成したものは25%に過ぎなかったが、ビヒクルコントロール又はAd5/RSV/GL2コントロールで治療したマウスのうち、70~80%が腫瘍を形成した。Ad5CMV-p53群の腫瘍の大きさは、コントロール群より著しく小さかった。これらの結果は、同所性ヒト肺癌のマウスモデルにおいて、Ad5CMV-p53がH226Brによる腫瘍形成を防止できることを示している。

例 7

Ad5CMV-p53と臨床治療

言うまでもなく、例5及び例6で説明したような動物モデルは、前臨床実験の一部として実施されるものである。臨床段階に入ると、患者毎にアデノウイルスを介した遺伝子伝達療法の適用を決定し、体内にアデノウイルスに特異的な抗体が存在するか、否かの試験を行う。抗体が存在しているか、あるいは過去に薬剤

又は天然物質に対するアレルギーの病歴がある場合には、綿密な臨床観察下で $10^3 \sim 10^6$ 程度の投与量で組換えアデノウイルスの試験的投与を行うのがよい。

Ad5CMV-p53による癌治療では、CMVプロモーターなどの好適なプ

ロモーター／エンハンサー要素の制御により、組換えアデノウイルスがp53を発現する。したがって、FDA (Food and Drug Administration) が人体への投与を許容する方法により、Ad5CMV-p53を製造し、精製しなければならない。このような方法としては、まず、塩化セシウム密度勾配遠心法を行い、これに続いて効果及び純度試験を行うことを含むが、これのみに限らない。

p53アデノウイルス治療方法には、直接投与又は局所投与と、より全身型の投与との、二つの好適な基本的方法がある。これらの方法によって、p53の変異に起因することで知られている各種の異なる癌を好適に治療することができる。全身投与としては、アデノウイルスを簡単に静脈内注射して、注射部位から遠い組織部位をウイルスに感染させることができ (Stratford-Perricaudet et al., 1991)、したがって、p53に起因するすべての悪性腫瘍の治療に好適である。ウイルスの静脈内注射用剤形としては、薬理的に許容できる溶液でもよいし、また、時間をかけて投与する注入剤でもよい。一般的に言って、機能を持つウイルス粒子を投与する場合、効果がある粒子数は $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{12}$ であると信じられている。

特に、肺癌の場合、もし所望なら、組換えアデノウイルスを物理的に直接に標的とすることができるが、このような場合、嚢胞性線維症の膜内外伝導調整遺伝子の気管支内投与と同様にして目的を達することができる (Rosenfeld et al., 1992)。この場合、組換えp53アデノウイルスは標的細胞の部位近くにデリバリーされる。

より詳しく言えば、次の方針にしたがって好ましい治療プロトコルを作成する。患者はまず、気管支鏡検査を受けて、狭窄の程度を見積る。内視鏡的に腫瘍を可

能な限り大きく切除する。気管支鏡検査法受診の際は、局所又は全身麻酔を施術することが望ましい。Stifcor™ トランス気管支鏡吸引針 (Stifcor™ transbronchial aspiration needle) (21g) を気管支鏡の生検チャンネルに通すことができる。こうした後、約10ml以下程度の少量のp53アデノウイルスを残存腫瘍部位に注射する。

使用するアデノウイルスは、複製を行うことができないので、ウイルスそのものが患者の健康に有害な影響を与えることはない。しかしながら、患者は治療中少なくとも48時間は入院して、急性副作用や、遅延性副作用をモニターする。過去において増殖欠損性アデノウイルスをヒトの遺伝子伝達媒体として使用する安全性について、懸念が表明されたこともあったが (Rosenfeld et al., 1992)、アデノウイルスの投与量を適当にモニターして、好ましからざる副作用の機会をさらに減ずる。

反応の必要性が存在しているか、否か、あるいは、毒性が存在しているか、否かを判断する規準にはいろいろとある。毒性の存在の判断規準の一助として、治療開始前に、腫瘍床 (tumor bed) の写真をとっておき、長径と垂線を測っておく。大きさは直径の積として記録する。腫瘍が再び成長を始めたら、これらのデータから再生速度を計算することができる。

疾患が進行性に転ずる時期も、最初の観察値から腫瘍の体積の減少値を引く計算を繰り返して、進行性疾患の徴候を得ることによって判定する。進行性疾患とは、病巣を測定して、直径の積の値が $\geq 25\%$ 増加していることを言う。進行性疾患であると判定する前に、患者に少なくとも2コースの治療を実施する。患者の生存日数はプロトコル開始の日から計算する。

追跡検査には、癌治療で日常的に行われている検査をすべて含める。これには、例えば臨床徴候のモニター、及び、各種p53遺伝子の発現パターンを検討する標準解析、分子生物解析のための政権材料の採取を含む。これらの解析では、

さに、伝達された遺伝子を取り込んだ細胞数、in vivoにおけるプロモーターの相対強度などについての情報を提供できるようにしてもよい。このようにして得たデータに基づいて、治療方法の調整を行うことが望ましい。治療方法の調整は、異なるプロモーターをもつアデノウイルス構成物、感染したほとんど腫瘍細胞、又はすべての腫瘍細胞が組換え遺伝子の非生理的な過剰発現を起こさないように、注射するPFUを変えることなどを含む。

in vivoにおいて、アデノウイルスが伝達した外因性遺伝子の発現は、長期間

持続することができると考えられる。ウイルスが伝達した外因性遺伝子の発現が長期間持続し、しかも、治療上の有効性を維持するためには、場合に応じて管理しなくてはならない。遺伝障害の改良に要求される発現レベルは、他の疾患を完治するのに要求されるレベルとかなり異なるために、マーカー遺伝子は、遺伝子の発現の治療持続性を見積もるのには、有効性において限りがある。

最良の実施態様に関連して、本発明の組成物と方法を説明したが、説明した組成物、方法、及び方法からなる工程又は一連の工程を変更することはできるが、これらの変更も本発明の概念、精神及び範囲内であることは、当業者にとって明白である。より詳しく言えば、本発明で説明した薬剤を、化学的及び生理的関連がある特定の薬剤で置換して、同一又は類似の結果を得ることができることは明白である。当業者にとって明白である、このような類似する置換及び変更は、以下に述べる請求の範囲で定義されている本発明の精神、範囲及び概念内であるものと見なす。請求されている事項及び方法は、過度の実験を行うことなく、製造及び実施することができる。

文 献

以下の文献は、本明細書に示される例示的な方法、及び、他の詳細な説明に補足する例示的な方法及び詳細な説明を与えるものであり、特に参照することによって、本明細書の一部とする。

Bargonetti, et al. (1991) *Cell* 65:1083-1091.

Boehringer Mannheim Biochemicals (1992). DOTAP for high efficiency transfections, *BMBiochemica* 9(1):17.

Boshart, M. et al. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41:521-530.

Bishop (1987) *Science* 235:305-311.

Casey, G. Lo-Hueh, M., Lopez, M. E., Vogelstein, B., and Stanbridge, E. J. (1991). Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* 6:1791-1797.

Dai, et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10892-10895.

Fields et al. (1990) *Science* 249:1046-1049.

Georges et al. (1993) *Cancer Res* 53:1743-1746.

Ghosh-Choudhury and Graham (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 147:964-973.

Gluzman et al., (1982) in *Eukaryotic Viral Vectors* (Gluzman, Y., Ed.) pp. 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Graham, F.L. and A.J. van der Eb. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell and R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen Virol.* 36:59-72.
- Grunhaus, A. and Horwitz, M.S. (1992). Adenoviruses as cloning vectors. *Semin. Virology* 3:237-2542.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Jaffe et al., (1992) *Nature Genetics* 1:372-378.
- Le Gal et al., (1993) *Science* 259:988-990.
- McGrory, W.J. et al. (1988). A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163:614-617.
- Mercer, W.E. (1992). Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Critic. Rev. Eukar. Gene Express.* 2:251-263.
- Mietz, et al. (1992) *EMBO* 11:5013-5020.
- Montenarh, M. (1992). Biochemical, immunological, and functional aspects of the growth-suppressor/oncoprotein p53. *Critic. Rev. Onco.* 3:233-256.
- Mulligan, (1993), *Science* 260:926.

- Ragot et al., (1993) *Nature*, 361:647-650.
- Rosenfeld et al., (1991) *Science*, 232:431-434.
- Rosenfeld et al., (1992) *Cell* 68:143-155.
- Shaw, et al., (1992) 89:4495-4499.
- Spandidos, et al. (1989), *J. Pathol.*, 157:1-10.
- Stratford-Perricaudet, L. and M. Perricaudet. (1991a).
Gene transfer into animals: the promise of
adenovirus. p. 51-61, In O. Cohen-Haguenauer and M.
Boiron (Eds.), *Human Gene Transfer*, Editions John
Libbey Eurotext, France.
- Stratford-Perricaudet et al., (1991b) *Hum. Gene. Ther.*
1:241-256
- Takahashi, T., Carbone, D., Takahashi, T., Nau, M.M.,
Hida, T., Linnoila, I., Ueda, R., and Minna, J. D.
(1992). Wild-type but not mutant p53 suppresses the
growth of human lung cancer cells bearing multiple
genetic lesions. 1992. *Cancer Res.* 52:2340-2342.
- Tooza, J. (1981). *Molecular biology of DNA Tumor
viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York.
- Travali, et al. (1990), *FASEB*, 4:3209-3214.
- Yonish, et al. (1991), *Nature* 352:345-347.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor gene. *Science*
254:1138-1145.
- Wilcock, et al. (1991) *Nature* 349:429-431.
- Zakut-Houri et al. (1985), *EMBO J.*, 4:1251-1255.
- Zhang, et al. (1993) *BioTechniques* in press.

配 列 表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

名 称： ボード・オヴ・リージェンツ, ザ・ユニヴァーシティ・
オヴ・テキサス・システム
街： ウェスト・セヴンス・ストリート 201
市： オースティン
州： テキサス
国： アメリカ合衆国
郵便番号： 78701
電話番号： (512) 499-4462
ファックス番号： (512) 499-4523

(ii) 発明者： ツァン, ウェイ - ウェイ
ロス, ジャック・エイ

(iii) 発明の名称： (組換え p 5 3 アデノウイルス方法と組成物)

(iv) 配列の数： 4

(v) 連絡先：

(A) あて先： Arnold, White & Durkee
(B) 街： P. O. Box 4433
(C) 市： ヒューストン
(D) 州： テキサス
(E) 国： アメリカ合衆国
(F) 郵便番号： 77210

(vi) コンピュータ読取可能な形式

(A) 媒体： フロッピーディスク
(B) コンピュータ： IBM PC 互換器
(C) オペレーティングシステム： PC-DOS/MS-DOS, ASCII
(D) ソフトウェア： Patentln Release #1.0, Version #1.25

(vii) 本出願データ：

- (A) 出願番号： 不明
- (B) 出願日： ここに出願
- (C) 分類： 不明

(viii) 先出願データ：

- (A) 出願番号： USSN 08/145,826
- (B) 出願日： 1993年10月29日
- (C) 分類： 不明

(ix) 代理人の情報：

- (A) 氏名： BARBARA S. KITCHELL
- (B) 登録番号： 33,928
- (C) 参照番号： UTFC350P--

(ix) 電子通信の情報：

- (A) 電話番号： (512) 418-3000
- (B) ファックス番号： (512) 474-7577
- (C) テレックス番号： 79-0924

(2) 配列番号： 1

i. 配列の特徴：

- A. 配列の長さ： 20
- B. 配列の型： 核酸
- C. 鎖の数： 一本鎖
- D. トポロジー： 直鎖状

ii. 配列の種類：

iii. 配列： 配列番号 1

GGCCCACCC CCTTGGCTTC

20

(2) 配列番号： 2

i. 配列の特徴：

- A. 配列の長さ： 20

- B. 配列の型： 核酸
- C. 鎖の数： 一本鎖
- D. トポロジー： 直鎖状

ii. 配列の種類：

iii. 配列： 配列番号 2

TTGTAACCAT TATAAGCTGC

20

(2) 配列番号： 3

i. 配列の特徴：

- A. 配列の長さ： 20
- B. 配列の型： 核酸
- C. 鎖の数： 一本鎖
- D. トポロジー： 直鎖状

ii. 配列の種類：

iii. 配列： 配列番号 3

TCGTTTCTCA GCAGCTGTTG

20

(2) 配列番号： 4

i. 配列の特徴：

- A. 配列の長さ： 20
- B. 配列の型： 核酸
- C. 鎖の数： 一本鎖
- D. トポロジー： 直鎖状

ii. 配列の種類：

iii. 配列： 配列番号 4

CATCTGAACT CAAAGCGTGG

20

【図1】

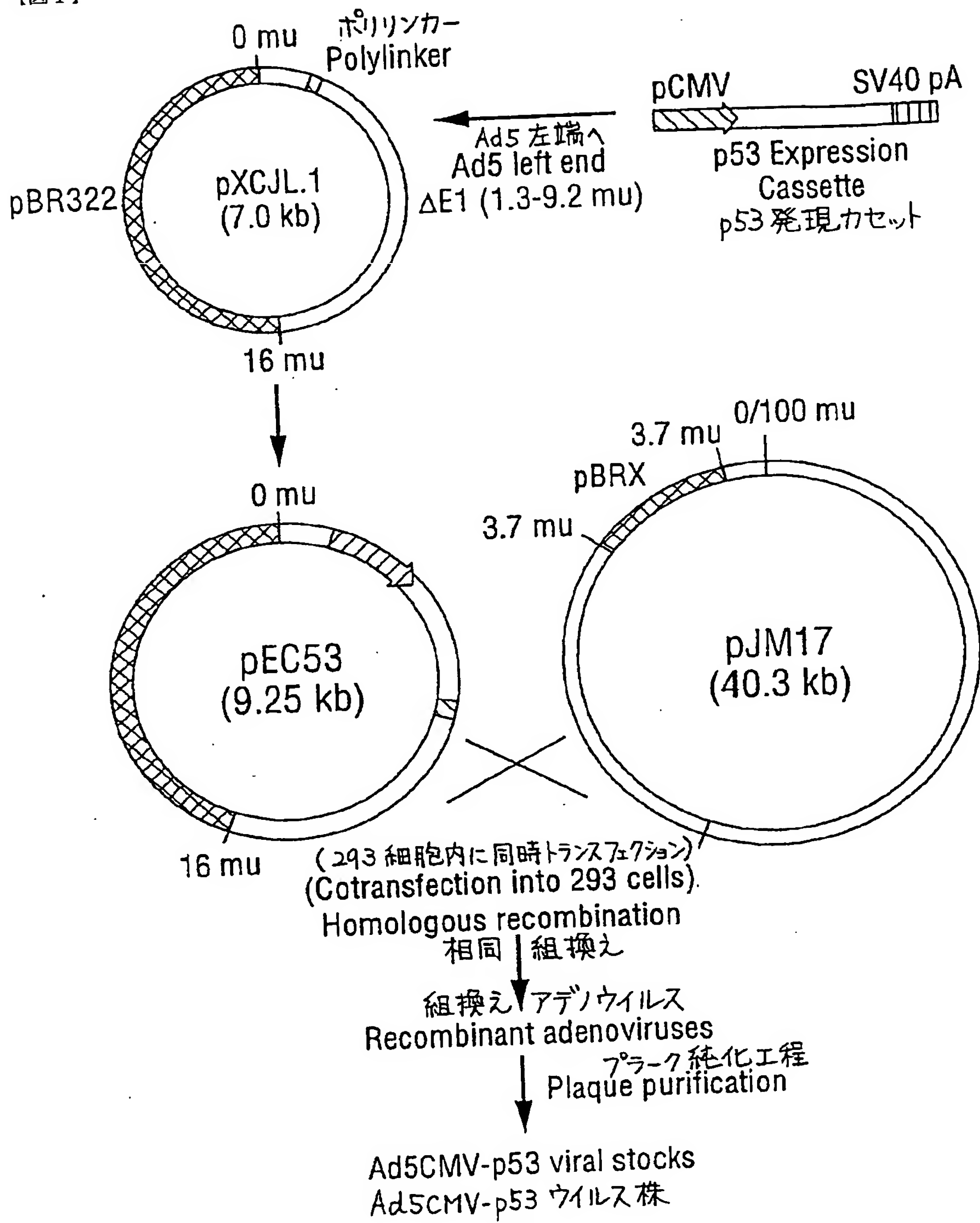


FIG. 1

【図2】

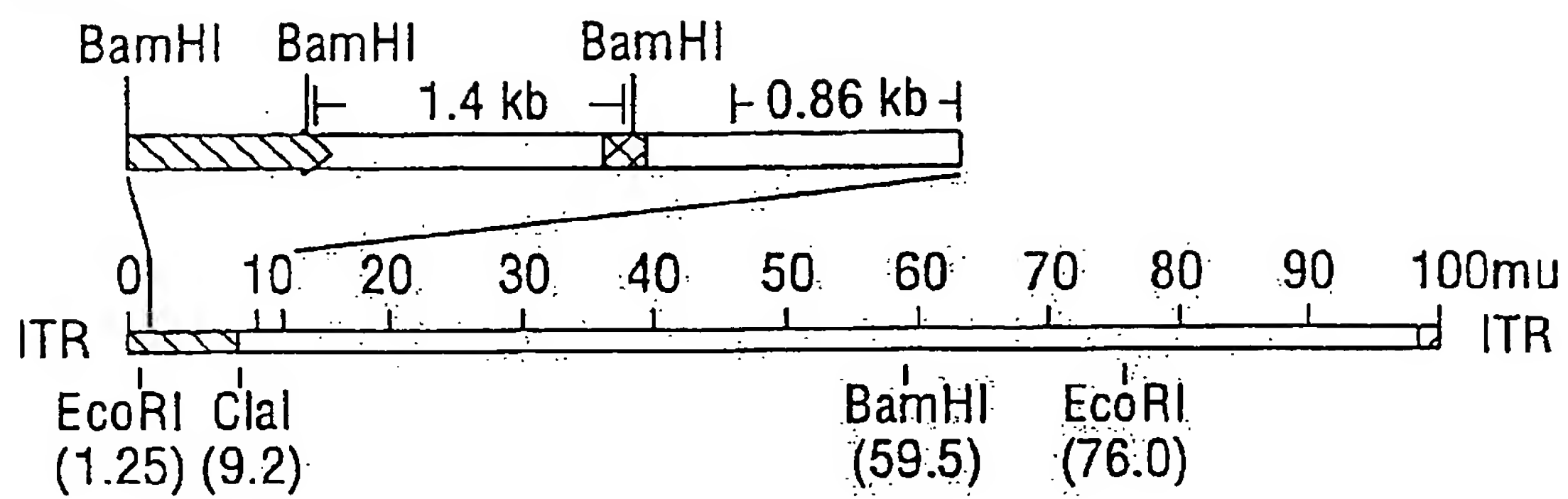


FIG. 2A

【図2】

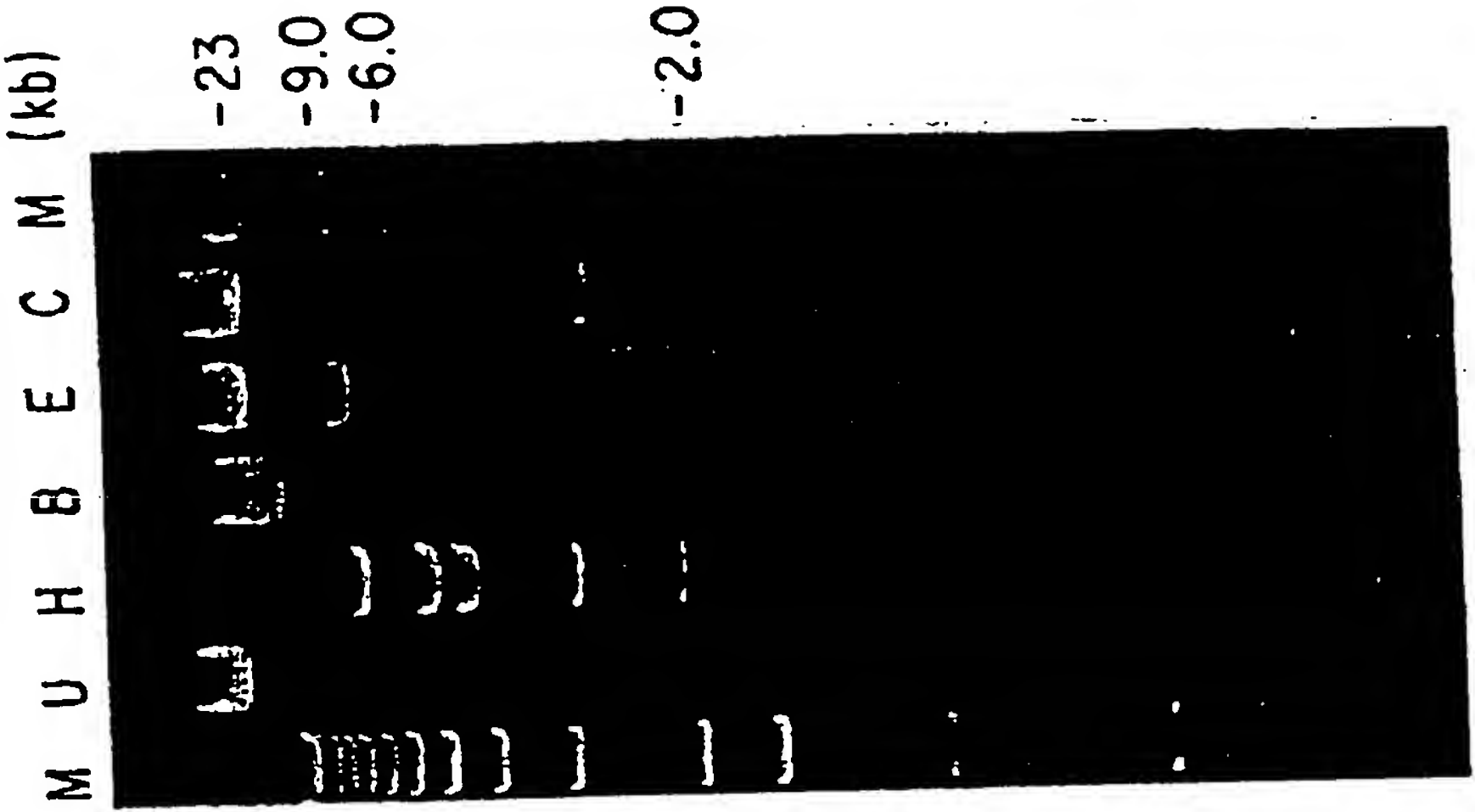


FIG.2C

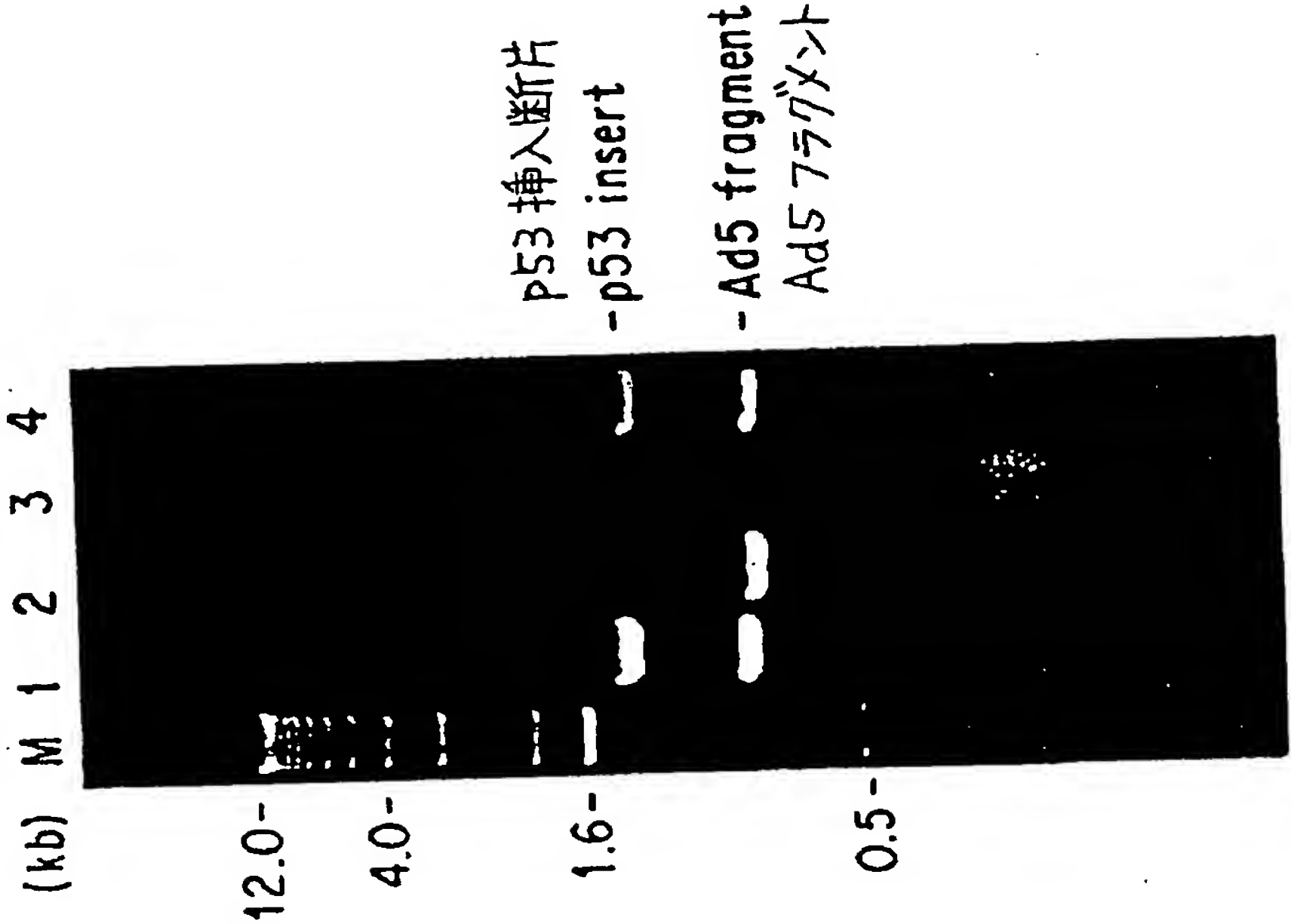


FIG.2B

【図3】

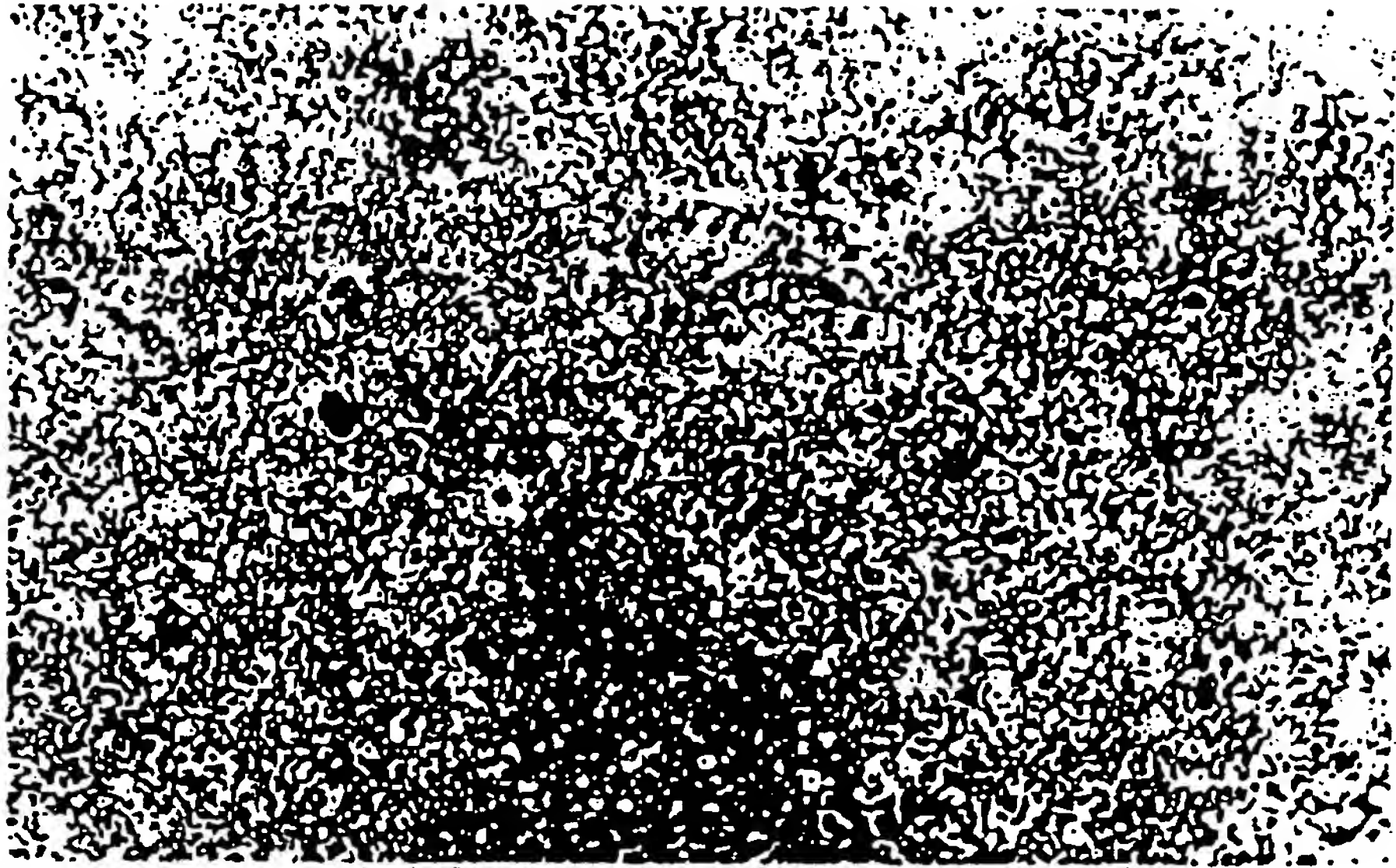


FIG.3B

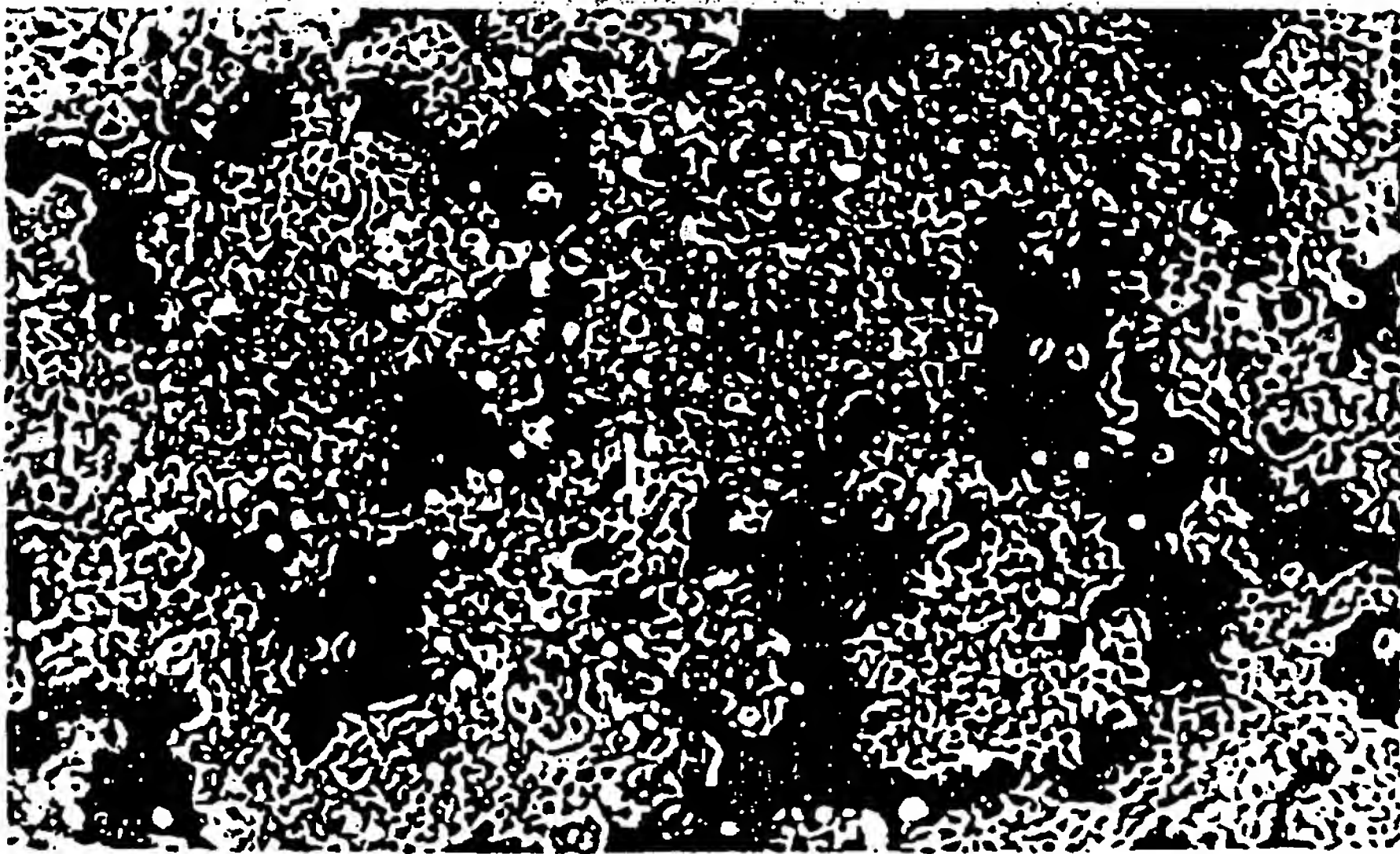


FIG.3A

【図3】

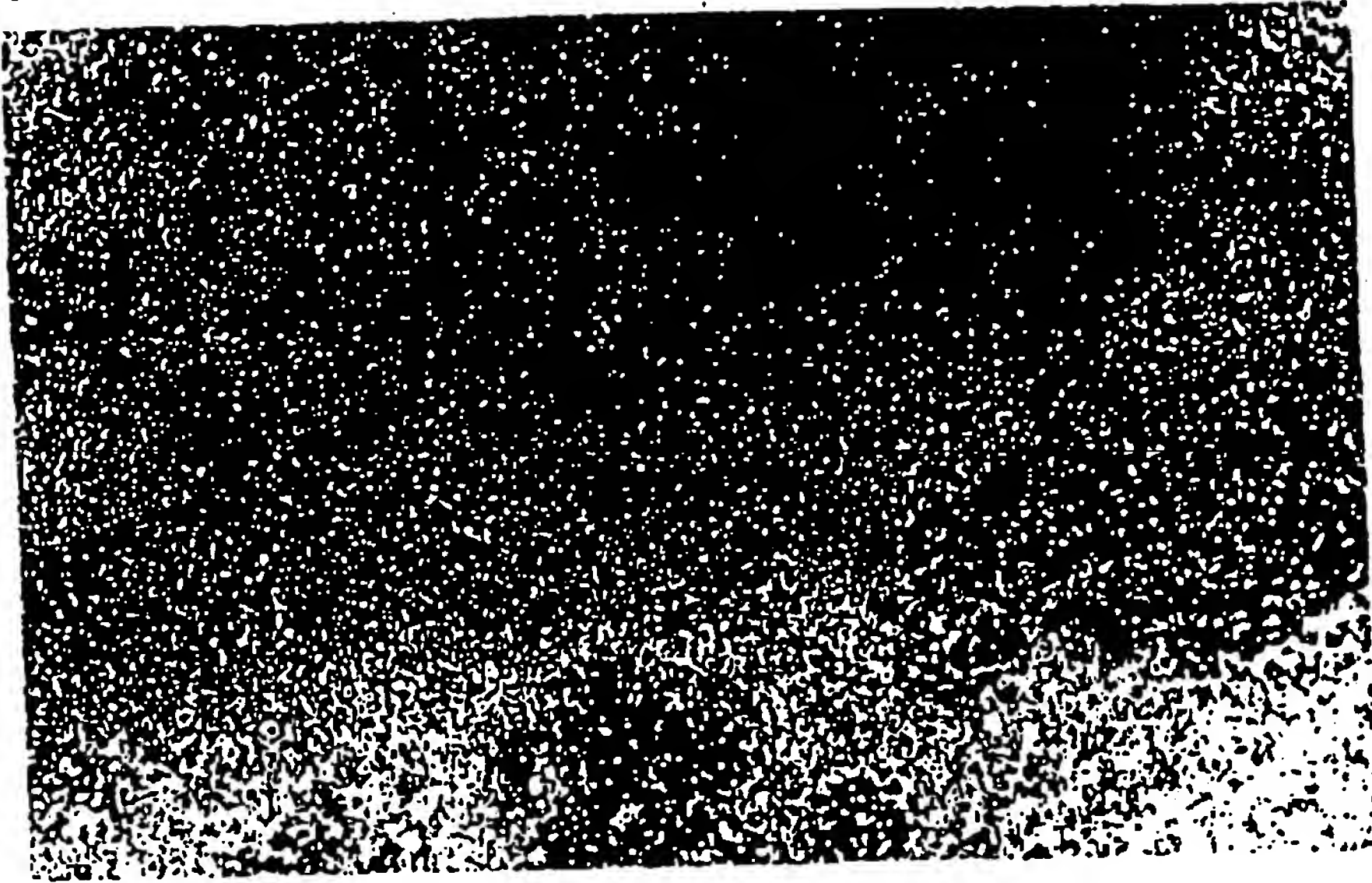


FIG.3D

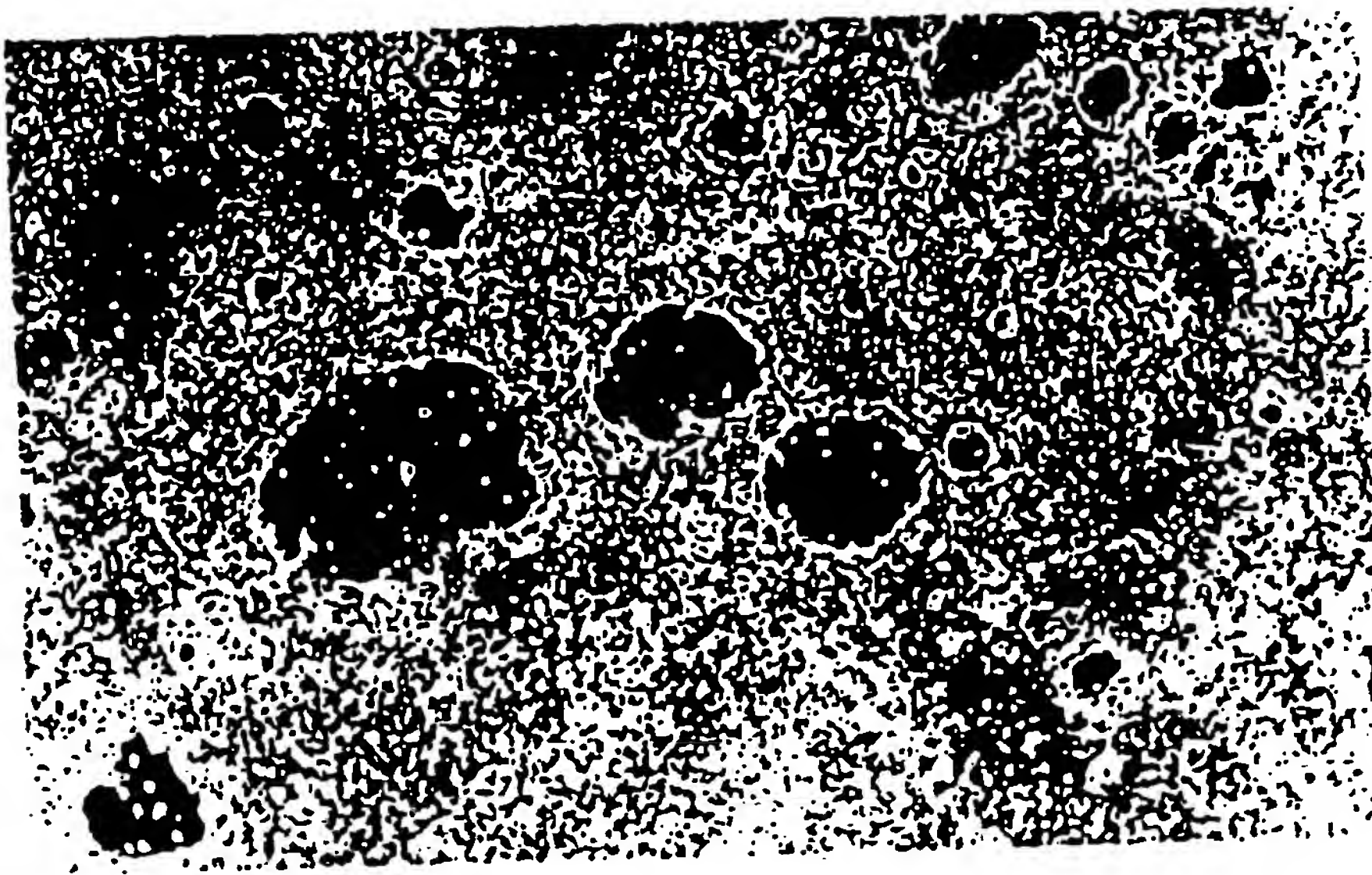


FIG.3C

【図 4】

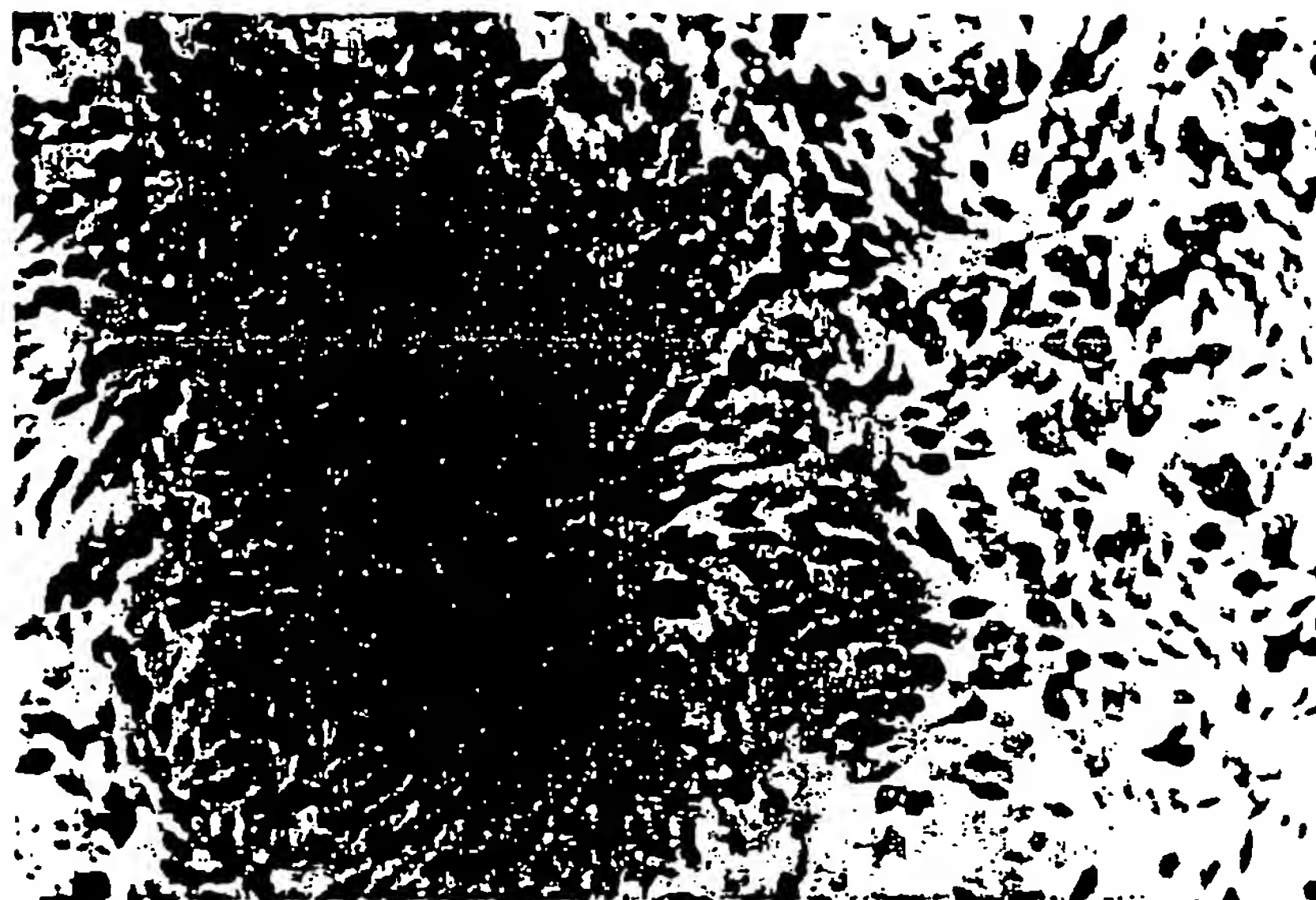


FIG.4A

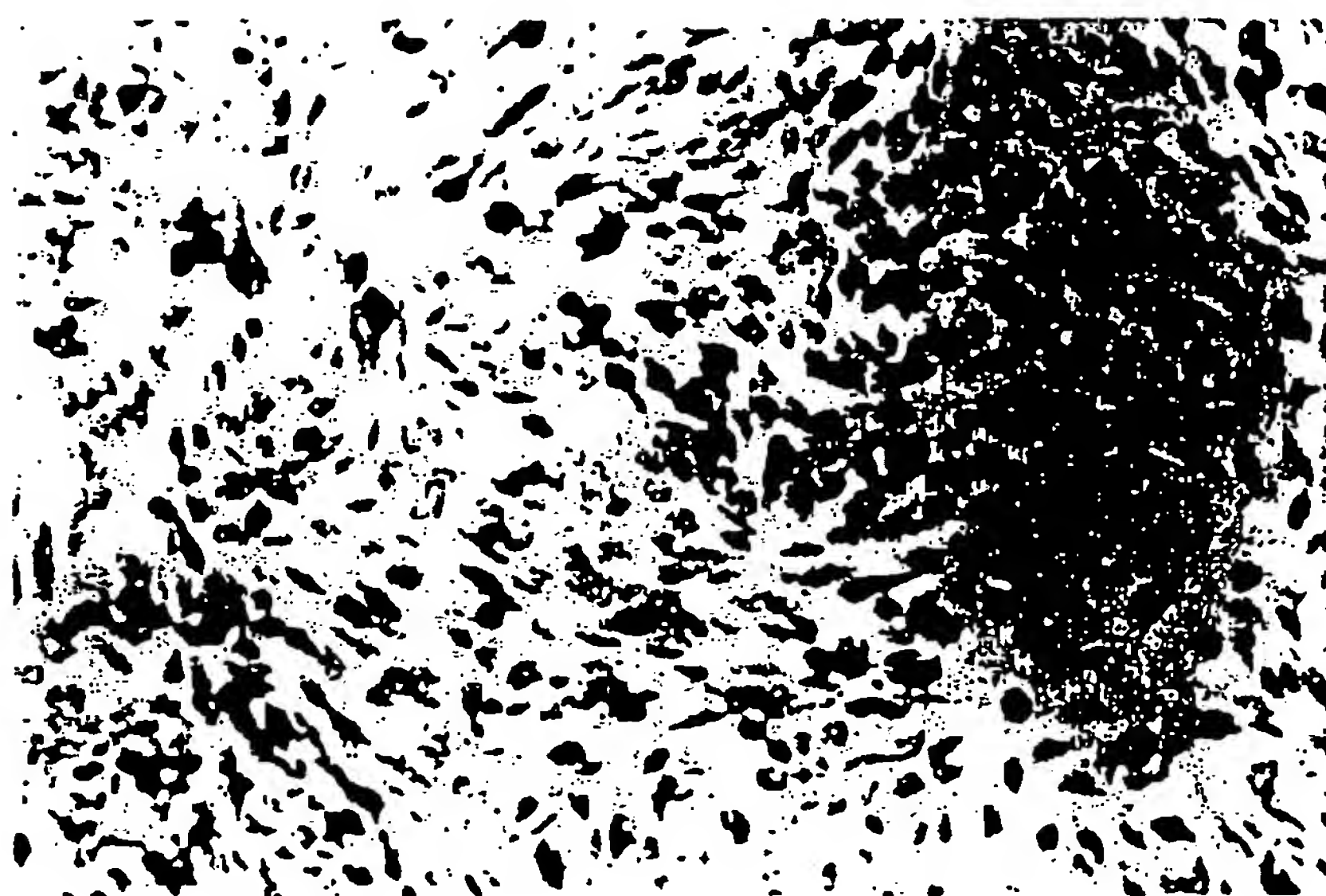


FIG.4B

【図4】

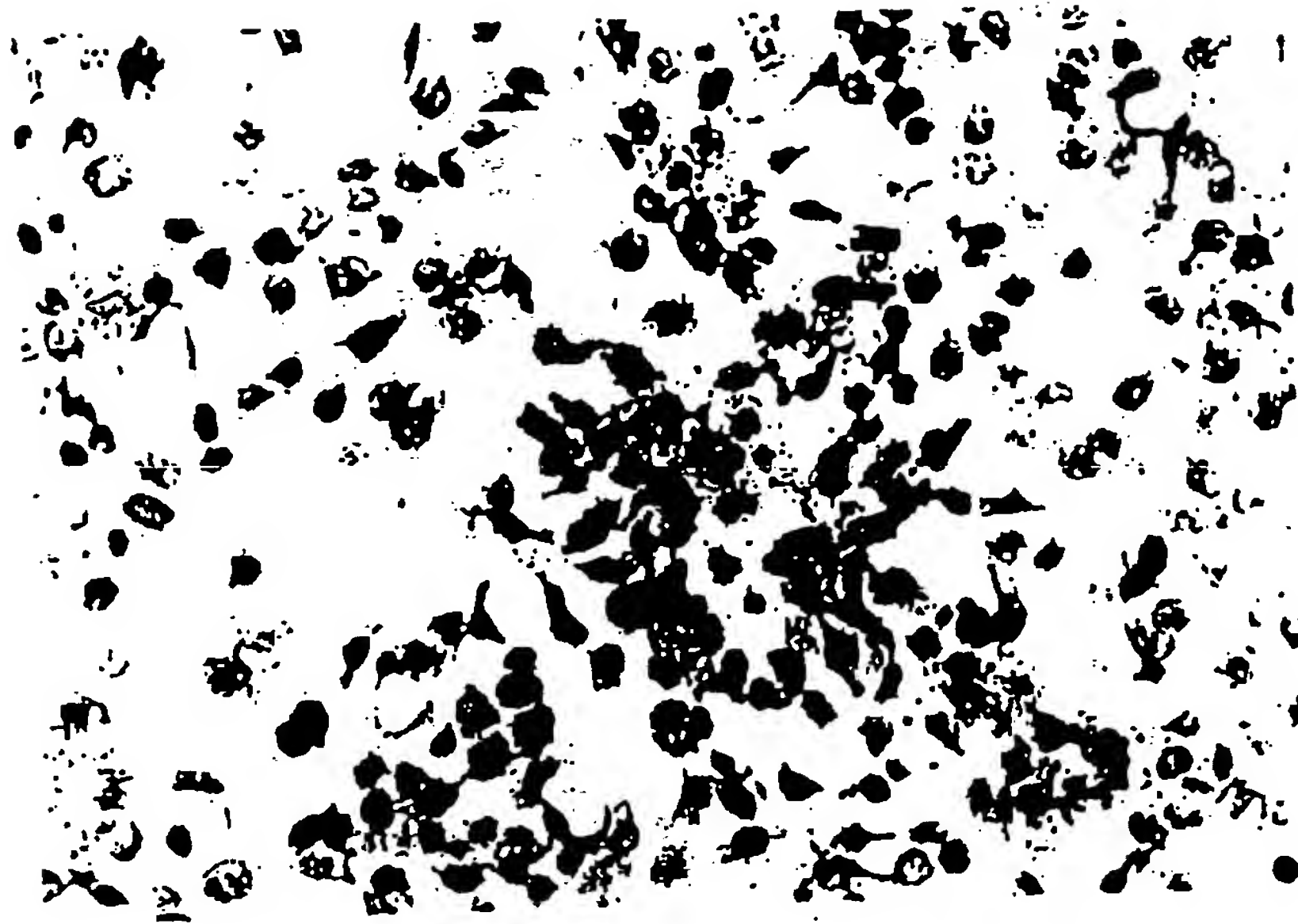


FIG.4C

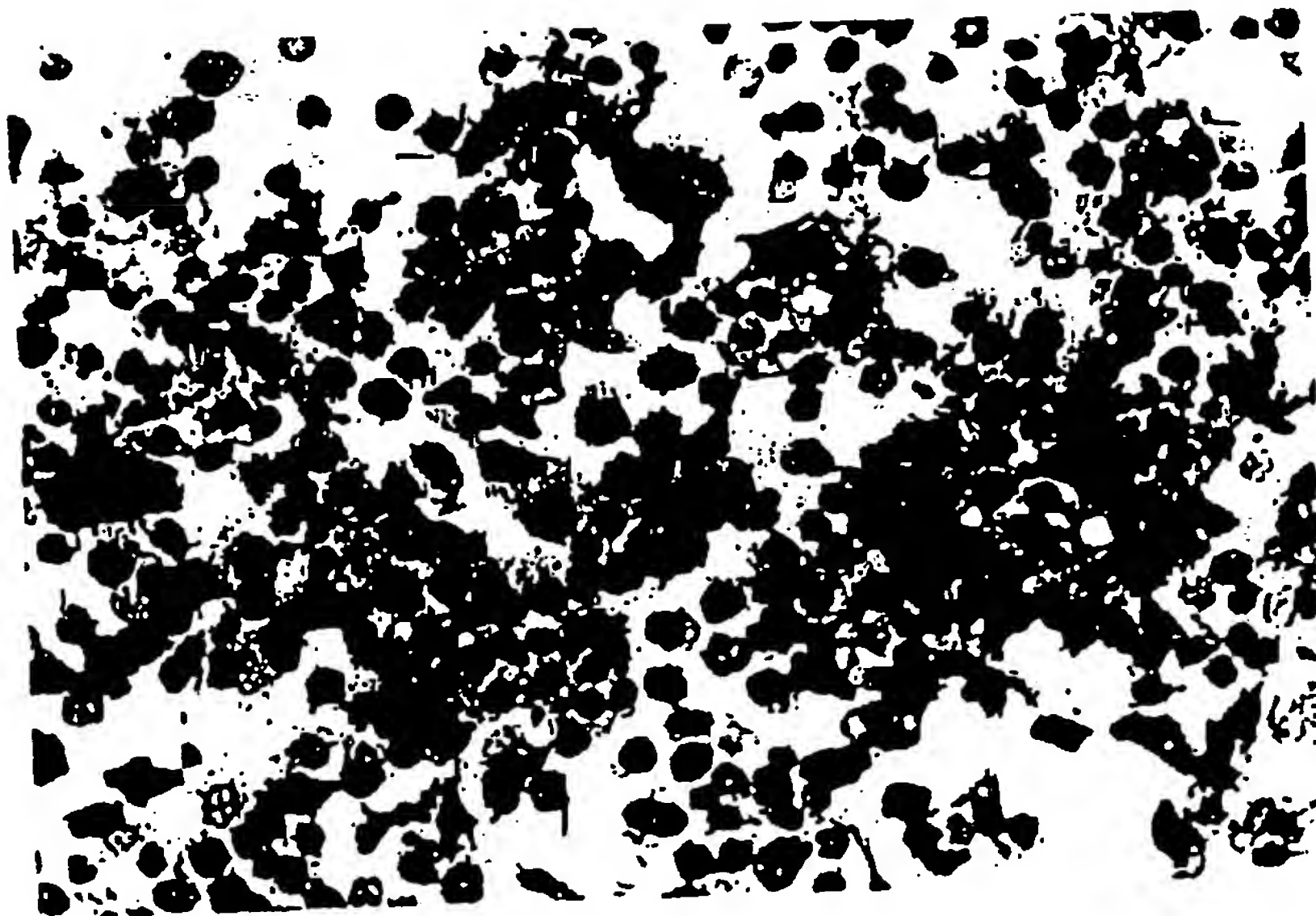


FIG.4D

【図5】

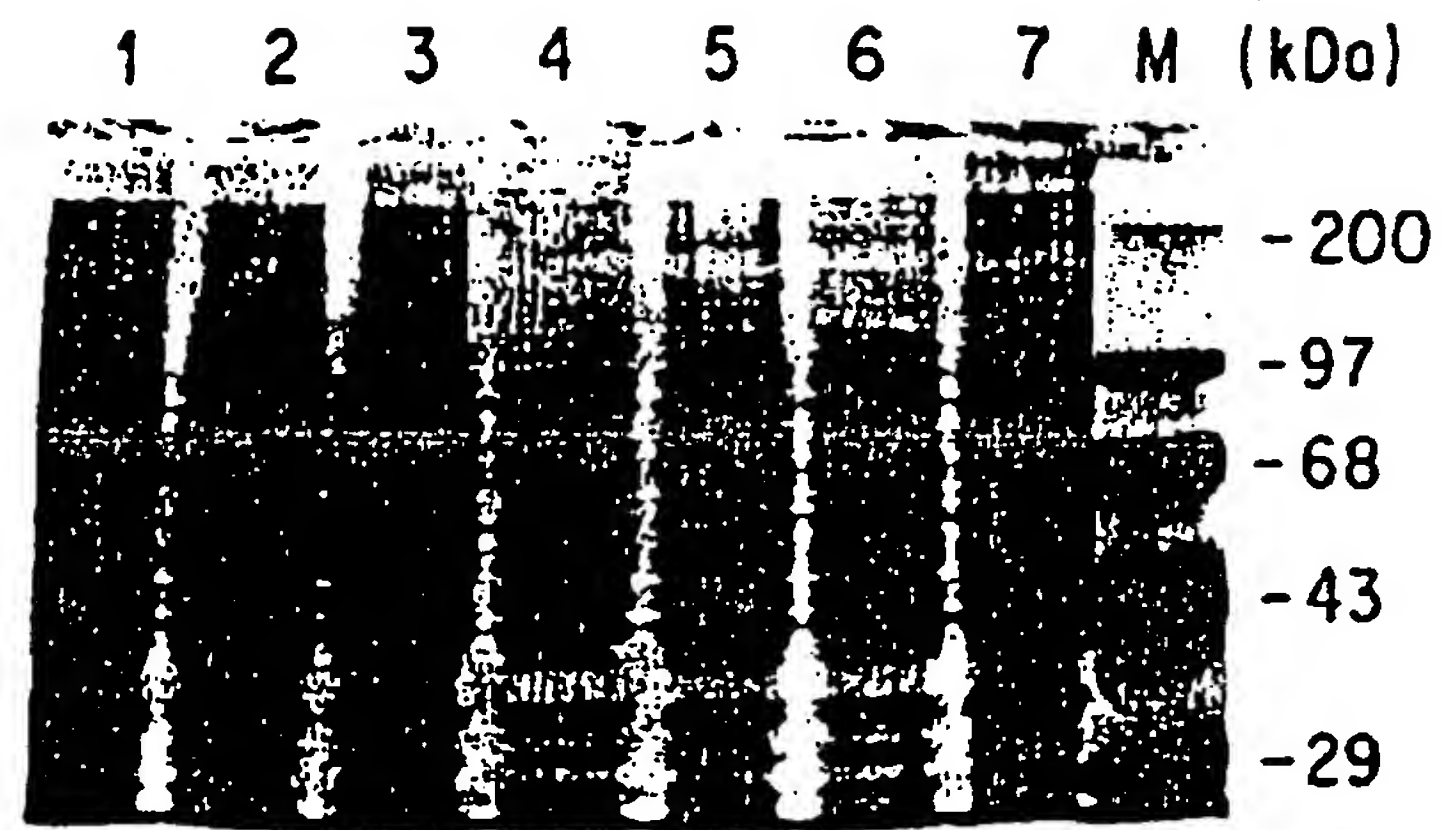


FIG.5A

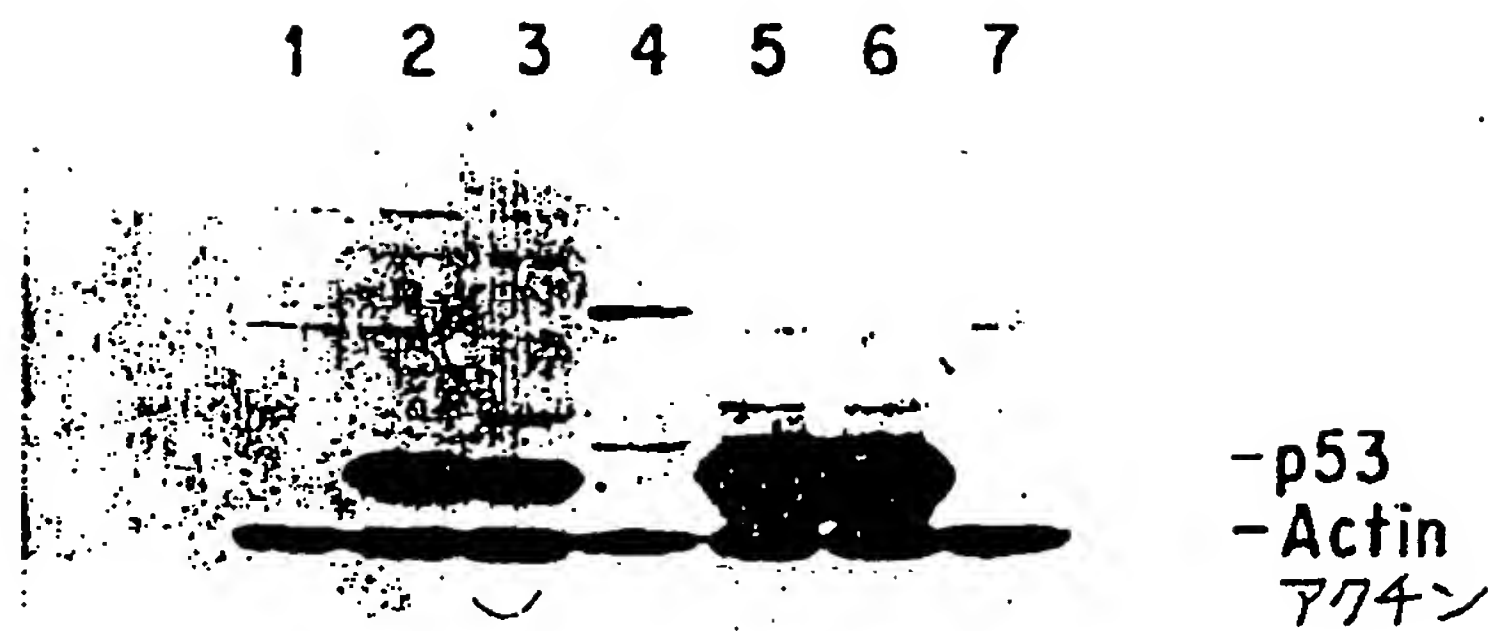
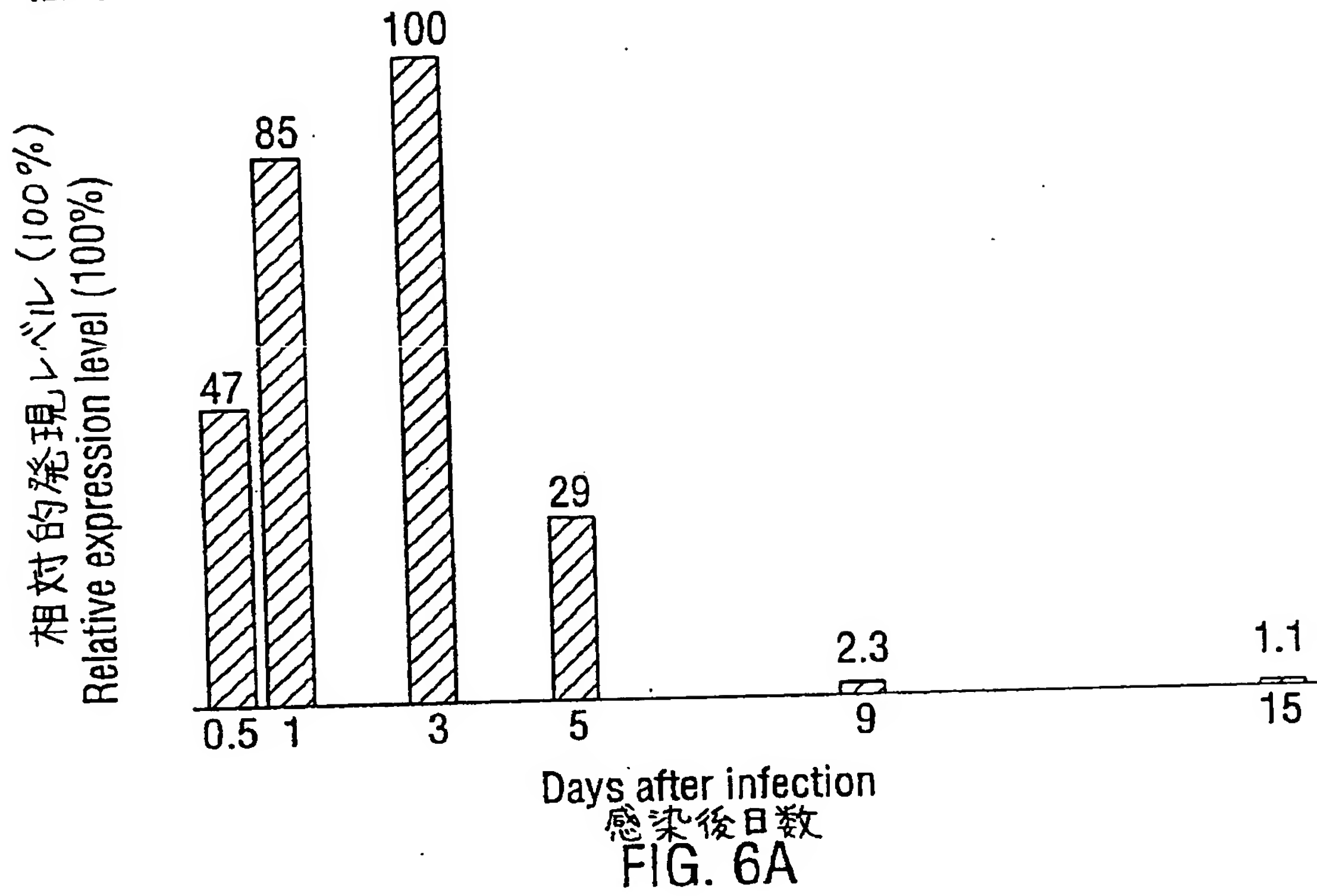
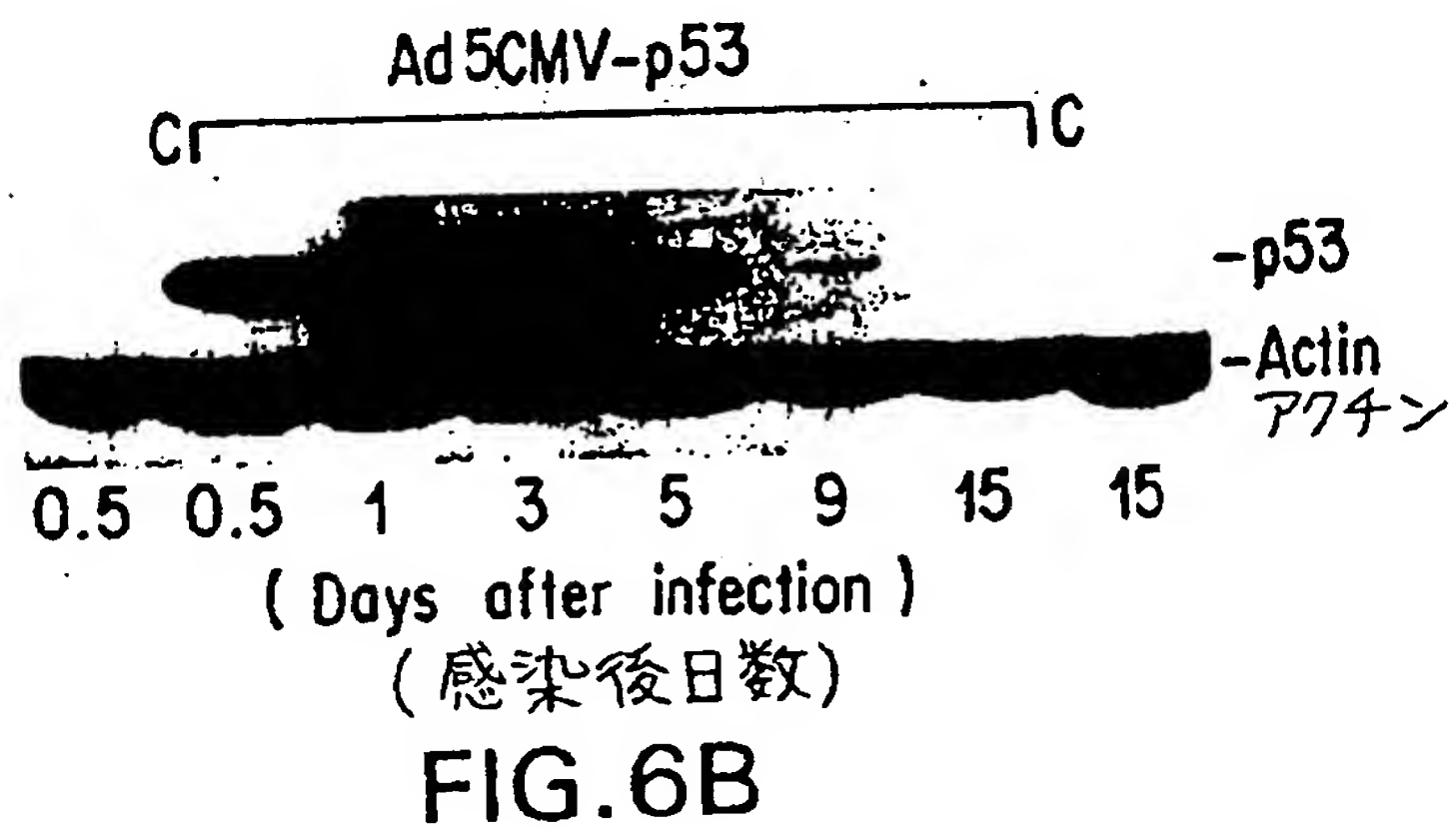


FIG.5B

【図6】



【図6】



【图7】

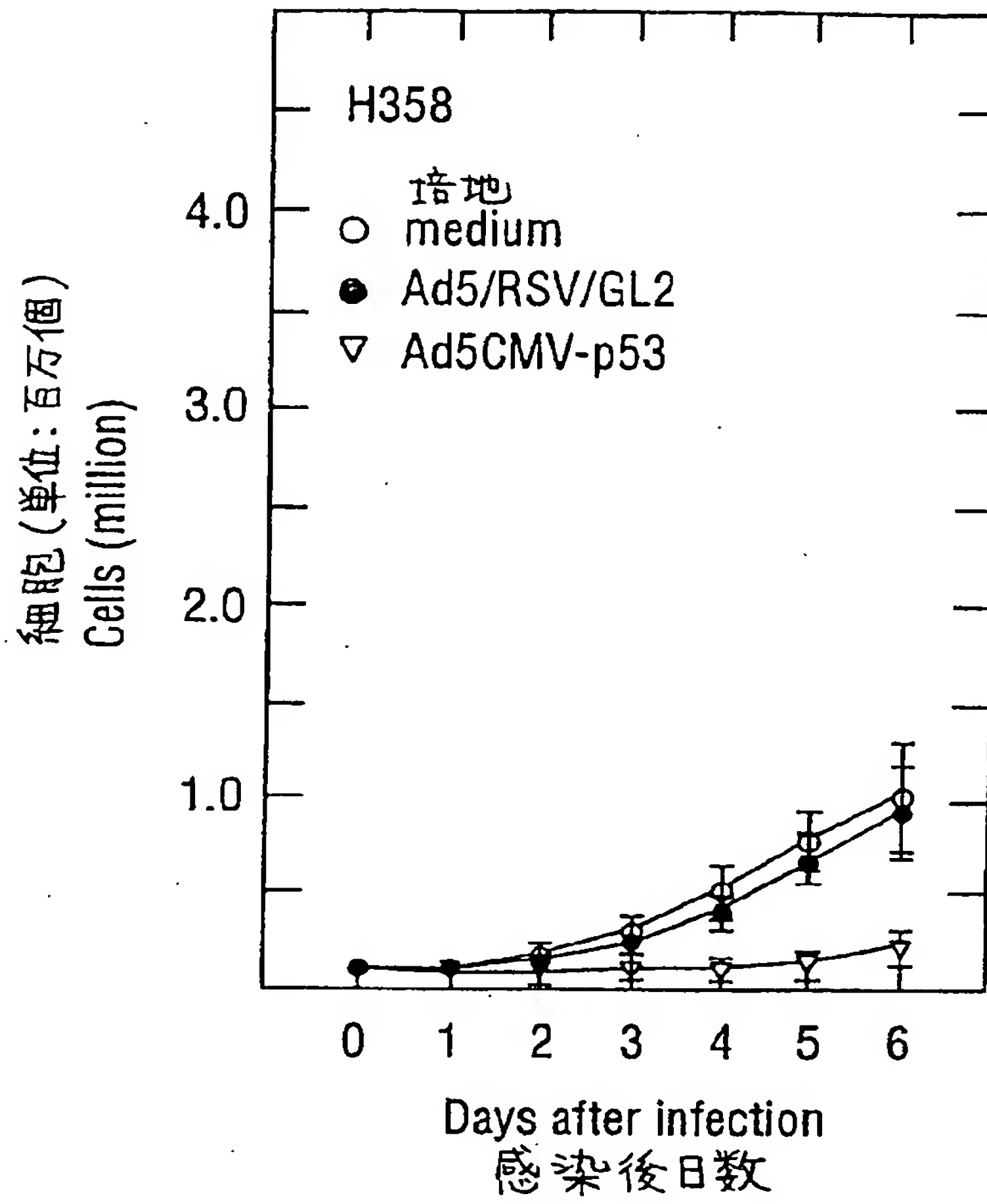


FIG. 7A

【图7】

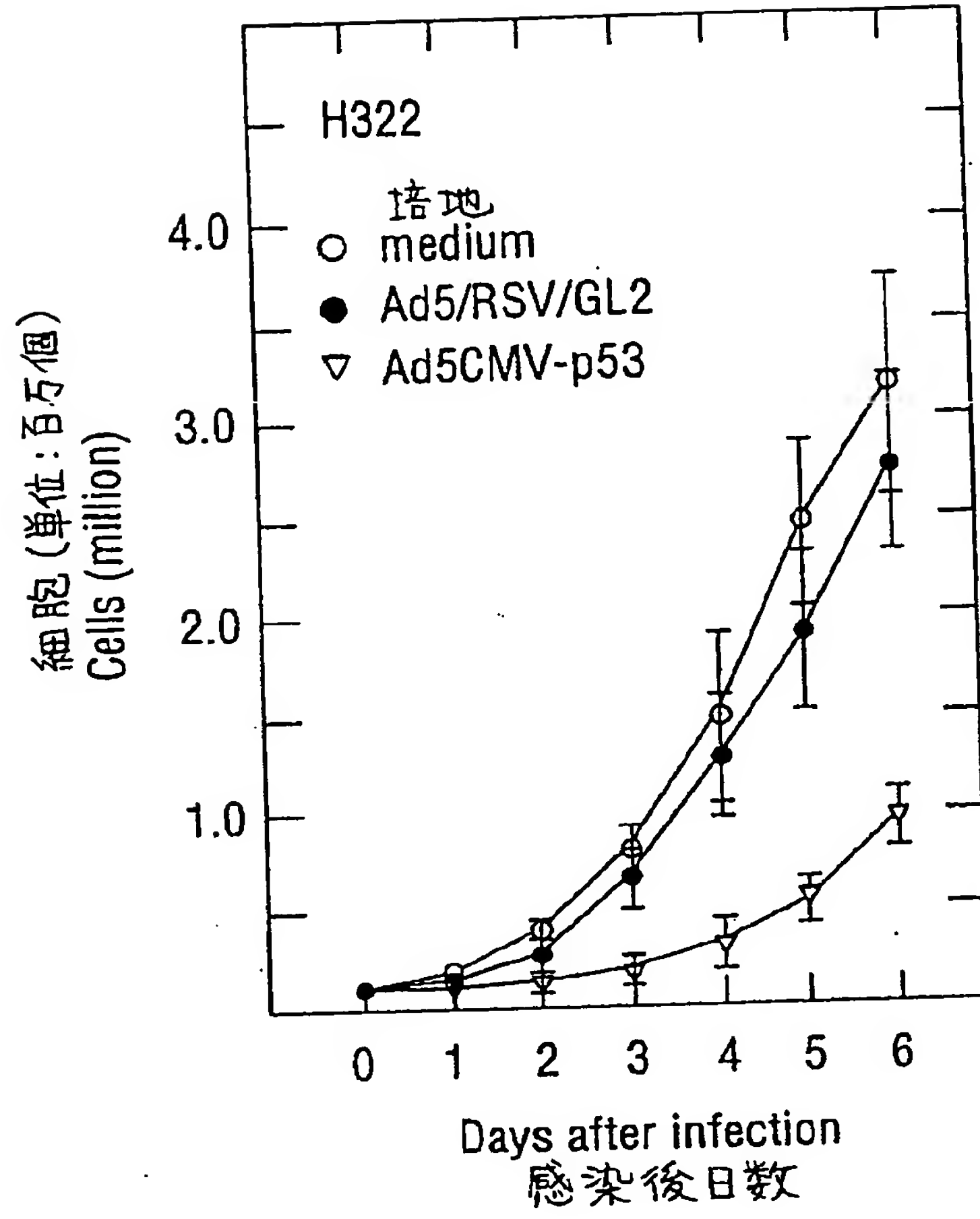


FIG. 7B

【图7】

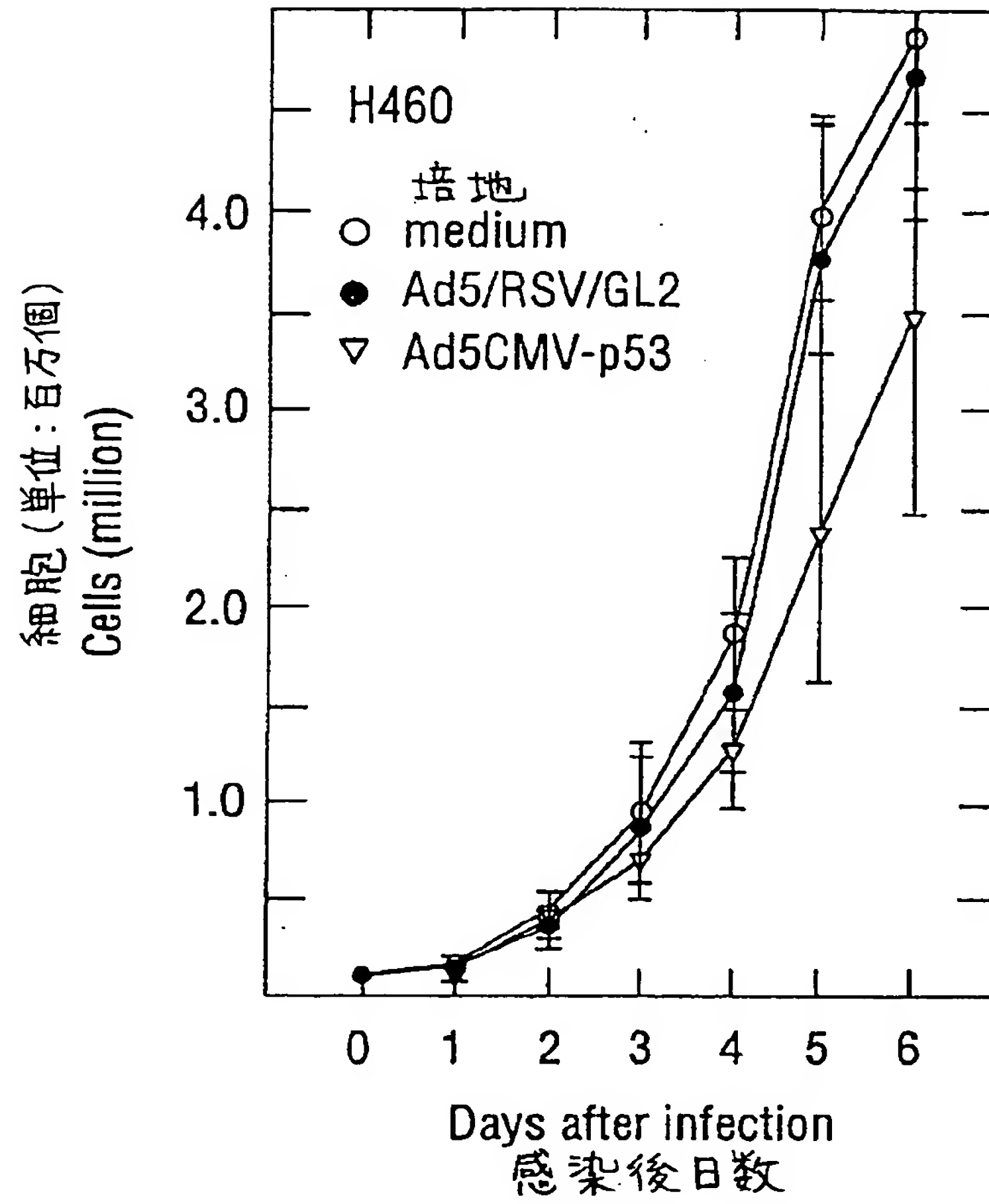


FIG. 7C

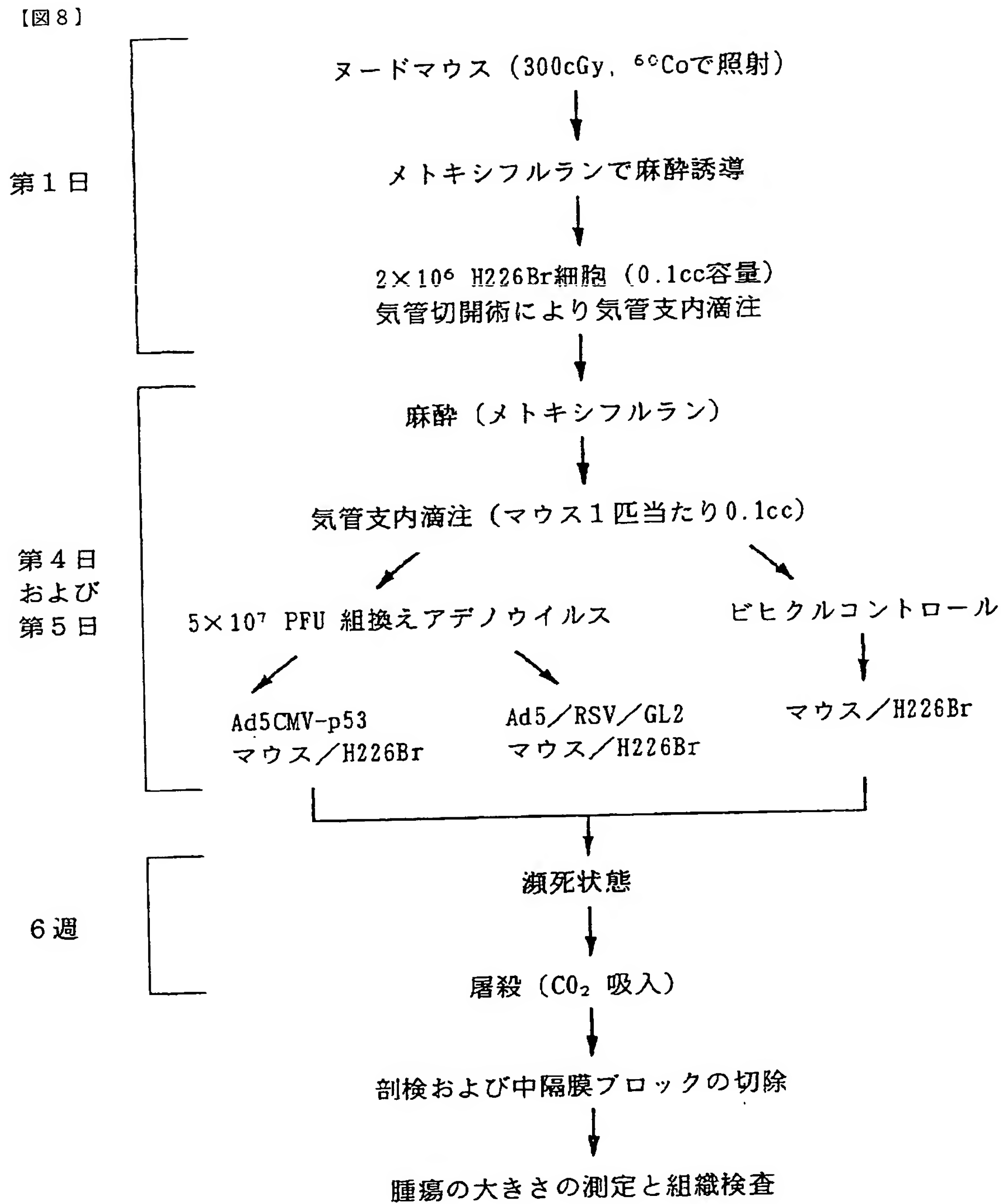


FIG. 8

【図 9】

FIG.9A



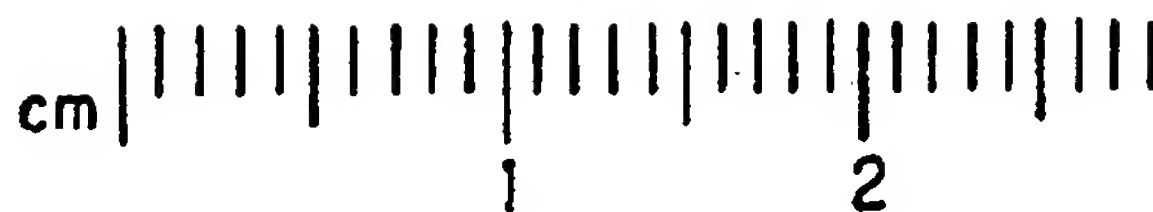
FIG.9B



FIG.9C



FIG.9D



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 94/12401 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/82 A61K48/00 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. SUPPL, no. 17E, 29 March 1993 page 204 WILLS, K.N. & MENZEL, P. 'Adenovirus vectors for gene therapy of cancer' voir résumé S 216 | 1 |
| Y | & Keystone Symposium on genetically targeted research and therapeutics. Antisense and gene therapy, Keystone, USA ;12 au 18 Avril 1993 | 2-13, 16-21 |
| X | --- WO-A-93 03769 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 4 March 1993 see page 10, line 1 - line 5; claims 1-5,12,13; figure 1 --- -/- | 1-5, 7-13, 16-21 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents : * A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance * F* earlier document but published on or after the international filing date * L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) * O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means * P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed * T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention * X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone * Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. * &* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 30 June 1995 | | 5.07.95 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 PatentAan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Hornig, H |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/US 94/12401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|------------------------|
| Y | FR,A,2 688 514 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 17 September 1993 see page 2, line 25 - page 3, line 5; claims 1-11 see page 8, line 1 - line 10 --- | 2-13, 16-21 |
| A | ONCOGENE, vol. 6, no. 10, October 1991 MACMILLAN PRESS LTD., LONDON, UK, pages 1791-1797, G. CASEY ET AL. 'Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene' cited in the application the whole document --- | 1-21 |
| P,X | WO-A-94 10323 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD) 11 May 1994 see page 14, line 20 - page 19, line 28; example 3 --- | 1-5, 7-13, 16-21 |
| P,X | WO,A,94 24297 (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); HADDADA HEDI (FR)) 27 October 1994 the whole document --- | 1-5, 7-13, 16-21 |
| E | WO,A,95 02697 (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 January 1995 see page 6, line 22; claims 1-30 see page 10, line 6, paragraph 4 - line 12 --- | 1-5, 7-13, 16-21 |
| P,X | BIOTECHNIQUES (1993), 15(5), 868, 870-2 CODEN: BTNQDQ; ISSN: 0736-6205, November 1993 ZHANG, W. W. ET AL 'Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis' the whole document ----- | 1-21 |

| | |
|--|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | international application No. PCT/US94/12401 |
| Box I (Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)) | |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark : Although claims 9-12, as far as they concern in vivo treatment of human or animals, and claim 13 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). | |
| Box II (Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)) | |
| <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: <div style="margin-top: 20px;"> <p>Remark on Protest</p> <div style="display: flex; justify-content: flex-end; gap: 20px;"> <div> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. </div> <div> <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. </div> </div> </div> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 94/12401

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9303769 | 04-03-93 | AU-A- 2500692 | 16-03-93 |
| | | CA-A- 2115742 | 04-03-93 |
| | | EP-A- 0648271 | 19-04-95 |
| | | JP-T- 6510665 | 01-12-94 |
| ----- | | | |
| FR-A-2688514 | 17-09-93 | AU-B- 3757093 | 21-10-93 |
| | | CA-A- 2102302 | 17-09-93 |
| | | EP-A- 0593755 | 27-04-94 |
| | | WO-A- 9319191 | 30-09-93 |
| | | HU-A- 66486 | 28-11-94 |
| | | JP-T- 6508039 | 14-09-94 |
| | | NO-A- 934061 | 09-11-93 |
| ----- | | | |
| WO-A-9410323 | 11-05-94 | NONE | |
| ----- | | | |
| WO-A-9424297 | 27-10-94 | FR-A- 2704234 | 28-10-94 |
| | | AU-B- 6572194 | 08-11-94 |
| ----- | | | |
| WO-A-9502697 | 26-01-95 | FR-A- 2707664 | 20-01-95 |
| | | AU-B- 7264694 | 13-02-95 |
| | | CA-A- 2144040 | 26-01-95 |
| | | FI-A- 951138 | 13-04-95 |
| | | NO-A- 950939 | 10-03-95 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM,
AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C
N, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU
, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT,
LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, N
Z, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK
, TJ, TT, UA, UZ, VN

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (uspto)